



Universidade Federal do ABC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

LUCAS VEIGA STANCATI

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA MORFOLOGIA E  
ORGANIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS FIBROSOS DE poli(L-co-D, L ácido láctico)  
(PLDLA) PRODUZIDOS POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO (FSS)**

SANTO ANDRÉ - SP

2020

LUCAS VEIGA STANCATI

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS FIBROSOS DE poli(L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA) PRODUZIDOS POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO (FSS)**

Trabalho apresentado ao curso de graduação da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

SANTO ANDRÉ - SP

2020

**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC**  
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stancati, Lucas Veiga

Influência de parâmetros de processo na morfologia e organização de arcabouços fibrosos de poli(L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA) produzidos por fiação por sopro em solução (FSS) / Lucas Veiga Stancati. — 2020.

73 fls.

Orientador: Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Santo André, 2020.

1. Biomateriais. 2. Polímeros. 3. PLDLA. 4. Mantas nanofibrosas. 5. Airbrushing. I. Santos Júnior, Arnaldo Rodrigues dos. II. Bacharelado em Ciências Biológicas, 2020. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior, pela paciência, dedicação e pelas contribuições durante toda a vigência deste trabalho.

Aos meus pais, Vladimir e Marli, minha irmã Natália e minha namorada Isabela pelo apoio e incentivo constantes.

Ao meu amigo Diego pelas sugestões e revisões.

“Absque sudore et labore nullum opus perfectum est.”  
(Sem suor e sem trabalho nenhuma obra é terminada)

Schrevelius

## Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração da tríade da engenharia de tecidos.....	16
Figura 2: Aerógrafo usado na confecção das mantas nanofibras de PLDLA.....	18
Figura 3: Representação da estrutura do copolímero amorfo poli(L-co-D, L ácido láctico) ou PLDLA (Adaptado de: MOTTA & DUEK, 2007).....	19
Figura 4: Aerógrafo extrudando a solução polimérica de PLDLA em um anteparo de papel laminado com distância suficiente para a formação de fibras.....	24
Figura 5: Coletor rotativo com papel laminado encoberto por fibras de PLDLA.....	25
Figura 6: Manta fibrosa de PLDLA recém produzida em um anteparo.....	29
Figura 7: Manta fibrosa de PLDLA confeccionada com a sobreposição de muitas camadas (esquerda) e poucas camadas (direita).....	29
Figura 8: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm ( $\sim 40$ mL).....	32
Figura 9: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm ( $\sim 40$ mL).....	33
Figura 10: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm ( $\sim 20$ mL).....	34
Figura 11: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm ( $\sim 20$ mL).....	35
Figura 12: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm ( $\sim 40$ mL).....	36
Figura 13: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm ( $\sim 40$ mL).....	37
Figura 14: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm ( $\sim 20$ mL).....	38
Figura 15: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm ( $\sim 20$ mL).....	39

Figura 16: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=8\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm.....	40
Figura 17: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=8\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm.....	41
Figura 18: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=8\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm.....	42
Figura 19: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=8\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm.....	43
Figura 20: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=10$ cm e $r=250$ rpm.....	44
Figura 21: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=10$ cm e $r=250$ rpm.....	45
Figura 22: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=10$ cm e $r=55$ rpm.....	46
Figura 23: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=10$ cm e $r=55$ rpm.....	47
Figura 24: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm.....	48
Figura 25: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm.....	49
Figura 26: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=10$ cm e $r=55$ rpm.....	50
Figura 27: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=10$ cm e $r=55$ rpm.....	51
Figura 28: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=10$ cm e $r=250$ rpm.....	53
Figura 29: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=10$ cm e $r=250$ rpm.....	53

Figura 30: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm.....	54
Figura 31: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=30$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm.....	55
Figura 32: Imagem macroscópica da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm (S-17B).....	56
Figura 33: Imagem por MEV da amostra obtida na condição $c=6\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=55$ rpm (S-17B).....	57
Figura 34: Gráfico da distribuição de espessura das fibras por amostra.....	62
Figura 35: Gráfico da distribuição de espessura da única amostra de $c=8\%$ com fibras ( $c=8\%$ , $p=35$ psi, $d=15$ cm e $r=250$ rpm).....	63
Figura 36: Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 5 amostras com $c=6\%$ e $p=35$ psi.....	64
Figura 37: Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 3 amostras com $c=6\%$ e $p=30$ psi.....	65
Figura 38: Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 3 amostras com $c=6\%$ e $r=55$ rpm.....	66
Figura 39: Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 5 amostras com $c=6\%$ e $r=250$ rpm.....	66
Figura 40: Gráfico da porcentagem de porosidade das amostras com desvio padrão..	68

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros utilizados nas amostras.....	26
Tabela 2: Tabela com as espessuras das amostras.....	31
Tabela 3: Tabela do Excel com as características microestruturais das amostras.....	58
Tabela 4: Tabela com os campos selecionados de rotação e fibras para gerar a tabela dinâmica.....	59
Tabela 5: Tabela dinâmica do Excel evidenciando a correlação da velocidade de rotação com a formação de muitas fibras.....	60
Tabela 6: Tabela da distribuição do número de fibras medida por intervalo de espessura, com as respectivas soma, média, mediana e amplitude de dispersão.....	61
Tabela 7: Tabela da porcentagem de porosidade de cada imagem e a respectiva média e desvio padrão para a amostra.....	67
Tabela 8: Tabela do Excel com as características analisadas mais relevantes das amostras.....	68

## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Materiais.....	23
3.2. Metodologia.....	23
3.2.1. Preparo das Amostras.....	23
3.2.2. Caracterização das Amostras.....	26
3.2.3. <i>Software</i> ImageJ.....	27
3.2.4. Determinação da Espessura das Fibras.....	27
3.2.5. Quantificação da Porosidade das Amostras.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
4.1. Produção das Fibras.....	28
4.2. Espessura das Fibras.....	61
4.3. Porosidade.....	67
5. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

## RESUMO

A engenharia de tecidos consiste na união de diversos ramos da ciência para a aplicação de materiais capazes de interagir com o organismo biológico. As fibras poliméricas possuem muitos usos e formas diferentes de confecção, como a fiação por sopro em solução. Este método apresenta a vantagem de produzir fibras de dimensões nanométricas de maneira barata, com o auxílio de um aerógrafo de pintura. O presente trabalho se propôs a produzir mantas nanofibrosas com o copolímero amorfo poli(L-co-D, L ácido láctico), ou PLDLA, para entender a influência dos processos na microestrutura das amostras. O PLDLA apresenta taxas de degradação *in vivo* que favorecem a regeneração do tecido e já demonstrou resultados promissores quando utilizados em artroplastias. Neste trabalho, foram produzidas 13 amostras de mantas nanofibrosas com variação de processos pré-determinados e, posteriormente, caracterizou-se a morfologia dessas amostras através de imagens obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Testou-se, a princípio, os parâmetros de concentração da solução polimérica (6% e 8%), rotação do anteparo coletor (55 e 250 rpm), pressão do compressor de ar (30 e 35 psi) e distância do aerógrafo ao coletor (10 e 15 cm). Depois de preparadas algumas amostras, decidiu-se por fixar os dois últimos parâmetros em 35 psi e 15 cm, respectivamente, por não demonstrarem nenhuma influência relevante nos resultados. As imagens de MEV foram analisadas em diferentes aumentos e estudadas quanto à presença, ou não, de fibras, filme e partículas. Também foi obtida a distribuição de espessura das fibras e a porosidade das amostras. Chegou-se por fim à conclusão através de dados de uma tabela dinâmica do Excel de que apenas a rotação do anteparo coletor influiu na produção de fibras, enquanto a concentração da solução não fez diferença. As porosidades das fibras ficaram semelhantes e a rotação influiu na distribuição do espectro de espessuras das fibras, que ficaram mais dispersas na rotação menor. Apesar do caráter artesanal da técnica e do pequeno número de amostras estudadas, os dados indicaram uma correlação interessante que precisa continuar sendo estudada.

**Palavras-chave:** Biomateriais, polímeros, PLDLA, mantas nanofibrosas, fiação por sopro em solução (FSS), *airbrushing*.

## ABSTRACT

Tissue engineering consists of the union of several branches of sciences to apply materials capable of interacting with the biological organism. Polymeric fibers possess lots of different uses and forms of fabrication, such as solution blow spinning. This method has the advantage of producing nanometer-sized fibers cheaply with the aid of a painting airbrush. The present work proposes to produce nanofiber mats with the amorphous copolymer poly(L-co-D, L lactic acid), or PLDLA, to understand the influence of process in the sample's microstructure. PLDLA shows rates of *in vivo* degradation that favor tissue regeneration and have already shown promising results when used in arthroplasties. It was made 13 samples with predetermined parameter variation and, subsequently, these samples were characterized by images obtained with a scanning electron microscope (SEM). At first, the parameters of polymeric solution concentration (6% and 8%), rotation of the collector (55 and 250 rpm), pressure of the air pressurizer (30 and 35 psi) and distance from the airbrush to the collector (10 and 15 cm) were tested. After making some samples, it was decided to fix the last two parameters at 35 psi and 15 cm, respectively, as they did not show any relevance in the results. The images were analysed in different magnifications and studied for the presence, or not, of fibers, film and particles. Fiber thickness distribution and sample porosity were also obtained. Finally, it was concluded through data from an Excel Pivot Table that only the rotation of the collector influenced fibers production, while the concentration of the solution made no difference. The porosity of the fibers became similar and the rotation influenced the distribution of the fiber thickness spectrum, which became more dispersed in the lower rotation. Despite of the artisanal character of the technique and the small number of samples, the data indicated an interesting correlation which needs to be further studied.

**Keywords:** Biomaterials, polymer, PLDLA, nanofiber mats, solution blow spinning (SBS), airbrushing.

## 1. INTRODUÇÃO

Engenharia de tecidos é um ramo interdisciplinar da ciência que combina conhecimentos de áreas diversas como biologia, engenharia, física e química, com o objetivo de produzir dispositivos que interajam com organismos biológicos com determinado propósito, a partir de materiais naturais e sintéticos. A engenharia de tecidos se utiliza de biomateriais, que são dispositivos que entram em contato com tecidos ou fluidos biológicos com propósito diagnóstico, cirúrgico terapêutico ou vacinal. Estes biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos, e podem ser encontrados na forma de sólidos, géis, pastas ou líquidos (PIRES *et al.*, 2015).

A engenharia de tecidos é um campo de amplitude, diversidade e constantes mudanças que combina métodos de biologia celular e tecidual com a engenharia e a cirurgia (LANGER & VACANTI, 1993; FISHER & MAUCK, 2013). Ela se baseia no uso de uma fonte celular (podendo ser do próprio paciente) em conjunto com biomateriais desenvolvidos como arcabouços, de modo a se criar *in vitro* uma estrutura que possa ser usada para o reparo ou substituição do tecido (HENCH, 1998; SANTOS Jr. & ZAVAGLIA, 2016). Na engenharia tecidual, existem três fatores muito importantes: (1) a fonte celular, (2) os biomateriais que atuam como suporte para as células e (3) os fatores de indução para o crescimento celular (SANTOS Jr. & ZAVAGLIA, 2016).

A engenharia de tecidos é um campo que surge da necessidade de contribuir como alternativa às soluções disponíveis, como de transplante de órgãos, reconstrução cirúrgica e uso de dispositivos mecânicos, como equipamentos de hemodiálise. Apesar dessas soluções serem capazes de salvar e melhorar a qualidade de vida das pessoas, ainda assim, não são suficientes, pois o número de doadores de órgãos é sempre muito inferior à demanda, cirurgias de reconstrução podem resultar em complicações de longo prazo e dispositivos mecânicos são incapazes de realizar todas as funções de um único órgão ou impedir deterioração progressiva do estado de saúde do paciente (LANGER & VACANTI, 1993).

## **Biomateriais para engenharia de tecidos**

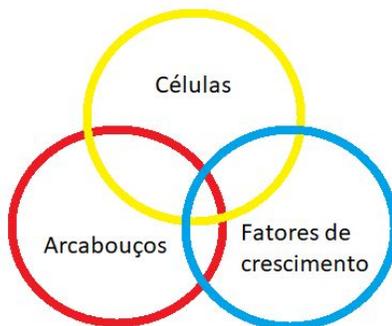
Biomaterial é uma substância desenvolvida para, sozinha ou como parte de um sistema complexo, direcionar o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico pela interação com organismos vivos (WILLIAMS, 2009).

Os biomateriais poliméricos podem ser classificados em permanentes ou temporários, dependendo do seu tempo de uso. Os materiais permanentes devem ser capazes de manter características mecânicas e físico-químicas por longos períodos de tempo, como no caso de próteses articulares, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares, dentre outras. Por outro lado, os materiais temporários devem preencher uma região lesada até que a recomposição tecidual se concretize ou, até mesmo, servir para redirecionar e estimular o processo regenerativo (SANTOS Jr. & WADA, 2007).

*Scaffolds*, ou arcabouços, são componentes essenciais da chamada Tríade da Engenharia de Tecidos (ver figura 1), também composta por células e fatores de crescimento. Os arcabouços são estruturas tridimensionais utilizadas para introduzir células, fármacos ou genes em um organismo. Os arcabouços podem ser classificados em dois grandes grupos: arcabouços que provêm células e arcabouços que provêm fármacos. O primeiro grupo consiste de arcabouços implantados ou semeados com células, que propiciam o crescimento de tecido. O segundo grupo consiste de arcabouços infundidos com fármacos em seus poros, capazes de liberação dos mesmos de forma constante e progressiva (TARUN *et al.*, 2011).

**Figura 1:** Ilustração da tríade da engenharia de tecidos.

Tríade da Engenharia de Tecidos



Fonte: Do próprio autor.

As fibras poliméricas são muito utilizadas desde o setor têxtil, sistemas de filtração, biossensores e também para aplicações biomédicas. As metodologias mais comuns na produção de fibras envolvem a fiação de um polímero no estado fundido ou de solução, que é capaz de gerar fibras com diâmetros na faixa de 5 a 500 nm. Novos métodos, como a eletrofiação, foram desenvolvidos para a produção de fibras com diâmetros submicrométricos e nanométricos (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A eletrofiação é uma técnica de produção de fibras através da extrusão de uma solução polimérica submetida a um potencial elétrico. Ela funciona quando é aplicada uma diferença de potencial entre a ponta de uma agulha de injeção e o coletor, ao mesmo tempo em que a solução polimérica é injetada sob fluxo constante. A técnica permite um bom controle do diâmetro das fibras e um bom alinhamento, sendo muito utilizada para fabricação de enxertos vasculares (LI *et al.*, 2010). Embora tenha um grande potencial comercial, a eletrofiação possui baixa eficiência de produção de fibra e os solventes usados no processo podem ser limitados devido às suas propriedades dielétricas (MEDEIROS *et al.*, 2009).

Além da eletrofiação, outro método bastante recente capaz de alcançar diâmetros de fibra micro ou nanométricos é a fiação por sopro em solução (FSS) ou

*solution blow spinning* (SBS) (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Essa técnica não é exatamente nova, mas foi adaptada para procedimentos de *drug delivery* e tem sido usada desde então dentro da engenharia de tecidos. A FSS consiste de um aparato borrifador com bocais concêntricos por onde um jato de solução polimérica é acelerado através de um fluxo de gás comprimido. Uma bomba de seringa controla a taxa de injeção e um compressor de ar controla a pressão. À medida em que o solvente evapora, o polímero é extrudado formando fibras e se deposita no anteparo à frente (HELL *et al.*, 2018).

As principais vantagens da FSS em relação à eletrofiação inclui os custos mais baixos da técnica, operação mais simples e segura e a possibilidade de se depositar fibras não apenas sobre materiais condutivos (SOUZA *et al.*, 2015). No futuro, a FSS terá uma relevância muito grande na pesquisa, para explorar novas combinações de polímeros e solventes, não disponíveis para a técnica de eletrofiação (DARISTOTLE, 2016).

Um método bastante simples e barato baseado no mesmo princípio da fiação por sopro em solução é o *airbrushing*, que emprega um aerógrafo de pintura, conforme ilustrado na figura 2. A partir da alimentação de uma solução polimérica e ar comprimido, é possível a obtenção de fibras do polímero em uso, as quais podem ser coletadas em um anteparo fixo ou rotativo e, assim, obter-se mantas fibrosas.

**Figura 2:** Aerógrafo usado na confecção das mantas nanofibras de PLDLA.



Fonte: Do próprio autor.

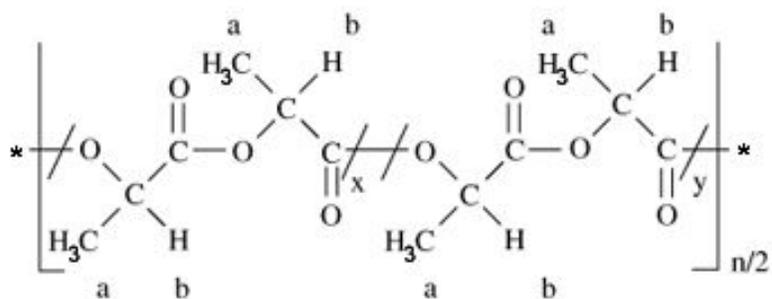
As fibras produzidas usando o *airbrushing* e a FSS, quando comparadas, são muito similares, como observado por HELL *et al.* 2018, inclusive, o diâmetro das fibras foi praticamente o mesmo nas duas técnicas, (132-1607 nm e 132-1268 nm), respectivamente. Entretanto, o *airbrushing* parece produzir mais partículas e feixes de fibras do que a FSS. Ambas as técnicas podem ser usadas para os mesmos propósitos, porém, apesar do *airbrushing* ser mais barato, também possui menos parâmetros que podem ser ajustados, o que implica em menor versatilidade e reprodutibilidade (HELL *et al.* 2018).

### **O poli(L-co-D, L ácido láctico)**

O copolímero amorfo poli(L-co-D, L ácido láctico) ou PLDLA é um biomaterial de muito interesse *in vivo*, que varia para a confecção de dispositivos biomédicos devido à sua taxa de degradação de 12 a 30 semanas, dependendo de sua massa molar, cristalinidade e dimensões. Além disso, apresenta propriedades mecânicas adequadas para muitas aplicações na área biomédica, já que não gera fragmentos cristalinos ao longo da degradação, que induziriam a uma resposta inflamatória aguda. O PLDLA

com massa molar da ordem de  $10^5$  g/mol e temperatura de transição vítrea de 55-60°C permite a fabricação de uma membrana que apresenta resistência à tração de 47,5 MPa e módulo de Young de 197 MPa (MÁS *et al.*, 2016). A estrutura do PLDLA pode ser vista na figura 3.

**Figura 3:** Representação da estrutura do copolímero amorfo poli(L-co-D, L ácido láctico) ou PLDLA.



Fonte: Adaptado de MOTTA & DUEK, 2007

As propriedades biológicas do PLDLA ainda não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que ele possui características mecânicas similares às do poli(L-lático) ou PLLA, que é um polímero semicristalino de alta resistência cuja cristalinidade aumenta com a progressão de sua degradação, o que pode levar a uma intensa resposta inflamatória. Entretanto, diferente deste, o PLDLA não apresenta o inconveniente de possuir um tempo de degradação muito alto e nem alta cristalinidade (MESSIAS *et al.*, 2014).

O processo de degradação do PLDLA se dá via hidrólise, com a vantagem de que os produtos gerados por essa degradação, como o ácido láctico, podem ser absorvidos pelo organismo (MOTTA & DUEK, 2009). Este polímero, além de atóxico e biocompatível, também pode ser utilizado para diferentes finalidades, como em reparos ósseos na região craniomaxilofacial (LANDES *et al.*, 2003), fraturas na região dos olhos (PUNJA *et al.*, 2006), suturas para reparos em tendões (VIINIKAINEN *et al.*, 2009),

cirurgias que envolvam reparos na região craniofacial, entre outras (COHEN *et al.*, 2001).

Arcabouços porosos de PLDLA já foram usados em artroplastias da articulação metacarpofalângica com resultados promissores. Eles foram capazes de manter a integridade por tempo suficiente para que o tecido circundante crescesse e o substituísse por tecido fibroso, em um período de 2-3 anos (TIIHONEN *et al.*, 2012).

As microesferas de PLDLA também estão demonstrando resultados promissores como carreadoras de medicamentos em *drug delivery*, como o *Paclitaxel (Taxol®)*, um importante medicamento usado no tratamento de uma ampla variedade de tipos de câncer, como o câncer de mama, ovário, cólon, pulmão e garganta (MARTINS *et al.*, 2014).

### **Avaliação dos biomateriais**

Os primeiros testes de biocompatibilidade que devem ser feitos em materiais com aplicações médicas é o teste de citotoxicidade, que é a avaliação da interação danosa entre o material e uma cultura celular. Um material não citotóxico não deve provocar a morte das células nem comprometer seu funcionamento (MALMONGE, 1999).

Os diversos métodos utilizados para determinar a citotoxicidade de um material podem ser agrupados nas seguintes categorias: avaliação dos danos morfológicos das células, quantificação dos danos celulares, quantificação do crescimento celular e quantificação dos aspectos específicos do metabolismo celular. Cabe ao investigador estar ciente dessas categorias e de onde determinada técnica se enquadra para comparar resultados com materiais ou dispositivos semelhantes (ISO 10993-5, 2009).

Os testes de toxicidade *in vitro* podem ser divididos em dois grupos: método por contato direto, onde as células são cultivadas em contato com o material, e método por

contato indireto, que consiste no método por extrato e no método por difusão em ágar. O teste em ágar pode ser realizado com o material a ser testado sendo separado da cultura celular por uma barreira de difusão (ágar ou agarose). No ensaio por extrato, substâncias extraídas do material a ser testado, através de um solvente, são postas em contato com a cultura celular (MALMONGE, 1999).

Normalmente, para que ocorra uma boa interação polímero-célula é necessário que se estabeleça a adesão celular ao substrato. Embora o substrato não necessite obrigatoriamente apresentar características semelhantes às da matriz extracelular para que a adesão celular ocorra, a similaridade físico-química é desejada quando o objetivo é a promoção da diferenciação celular ou para que um determinado polímero tenha uma interação mais efetiva no sítio de implantação (FISHER & MAUCK, 2013; SANTOS Jr. & ZAVAGLIA, 2016). Dessa forma, atualmente, busca-se a produção de polímeros que apresentem características físico-químicas e mecânicas mais próximas possível a dos tecidos nos quais serão implantados.

A boa integração do biomaterial com células ou tecidos depende ainda da própria estrutura dos dispositivos produzidos. Os dados na literatura parecem indicar que materiais porosos promovem o crescimento celular. A distribuição uniforme e as interconexões dos poros são importantes para facilitar a formação de tecidos na forma de uma rede organizada, tendo grande aplicação na reconstrução tecidual (TARUN *et al.*, 2011). *In vivo*, a porosidade e interconexão dos poros são essenciais para a proliferação de vasos, facilitando a nutrição do tecido ao redor do implante. Assim, diferentes tipos de arcabouços contendo PLLA vêm sendo desenvolvidos e testados como substratos para o crescimento celular.

Em relação aos arcabouços fibrosos, não apenas a natureza do material é importante, mas também a morfologia e o padrão das fibras desempenham um papel fundamental para garantir o sucesso na engenharia de tecidos. Vários tecidos e órgãos têm seu próprio padrão particular de organização das fibras, e as características topográficas e mecânicas são cruciais para as células sobreviverem e proliferarem, a

fim de se tornarem tecidos funcionais. Assim, é necessário entender a interação entre célula e matriz extracelular dos tecidos (MEC). Dependendo da técnica escolhida, ele permite organizar o padrão de orientação da fibra, as dimensões da fibra, o tamanho dos poros e assim por diante. Além disso, existem vários métodos disponíveis no mercado com diferentes faixas de custo, disponibilidade, processabilidade e resultados (GIORNO *et al.*, 2019; IGUMA *et al.*, 2019).

Desta forma, neste trabalho propomos o desenvolvimento de arcabouços de PLDLA, um polímero já utilizado em engenharia de tecidos, na forma fibrosa, com a intenção de simular ainda que parcialmente os componentes fibrosos da matriz extracelular. Usamos o método da FSS com *airbrushing*, por se tratar de um método rápido e de baixo custo.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Geral**

Determinar a influência de parâmetros do processo de fiação por sopro em solução (FSS) na formação de nanofibras de poli(L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA).

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Produzir amostras de PLDLA usando o método de fiação por sopro em solução (FSS);
- Caracterizar essas amostras por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinar a distribuição de espessura das fibras e a porcentagem de porosidade das amostras.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

- Poli(L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA) (70/30, S18B =  $M_w=253.026$  g/mol e S17B =  $M_w=143.000$ ), fornecidos pelo Laboratório de Biomateriais da PUC-SP;
- Solvente (clorofórmio – P.A. Synth);
- Aerógrafo (Steula - BC 66);
- Compressor de ar (Schuster - S45);
- Capela de fluxo laminar;
- Agitador magnético (GO stirrer - MS-H-Pro);
- Balança (CE - AW220);
- Coletor rotativo;
- Micrômetro externo (Digimess - 110.200A);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (QUANTA 250 - FEI);
- *Software* ImageJ.

#### 3.2. Metodologia

##### 3.2.1. Preparo de Amostras

No presente trabalho foram obtidas amostras nanofibrosas de PLDLA empregando a técnica de *airbrushing*, com variações de parâmetros do processo (concentração da solução e rotação do anteparo coletor) para analisar sua influência na formação de fibras.

Primeiro separou-se os grumos de PLDLA e pesou-se (6 g para a concentração de 6% e 8 g para a concentração de 8%). Em seguida, misturou-se o PLDLA em 100 mL de clorofórmio, medidos em uma proveta, e, com o auxílio do agitador magnético, as soluções foram totalmente dissolvidas em um erlenmeyer. A solução então pôde ser usada no aerógrafo ou armazenada em geladeira.

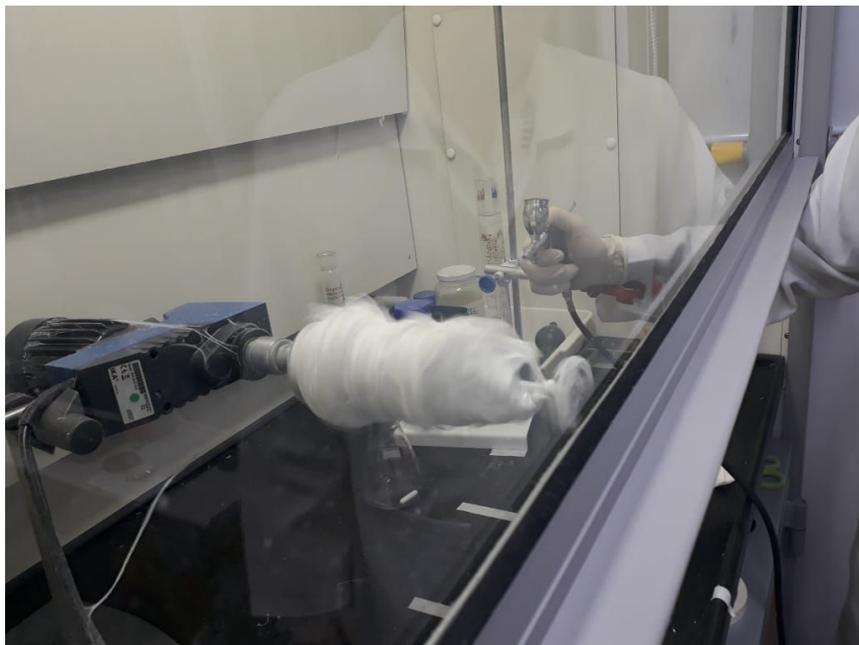
Para a obtenção das amostras de mantas, o aerógrafo foi conectado ao compressor, onde a pressão foi regulada para o valor de pressão de trabalho. Na sequência, a solução de PLDLA foi depositada no reservatório do aerógrafo e estava pronta para ser extrudada com o acionamento do gatilho.

**Figura 4:** Aerógrafo extrudando a solução polimérica de PLDLA em um anteparo de papel laminado com distância suficiente para a formação de fibras.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 5:** Coletor rotativo com papel laminado encoberto por fibras de PLDLA.



Fonte: Do próprio autor.

A concentração da solução, assim como a rotação do coletor, foram previamente ajustadas de acordo com os parâmetros já definidos (Tabela 1).

Os parâmetros que sofreram variação durante o preparo das amostras foram a concentração da solução do polímero e a velocidade de rotação do anteparo coletor. Convencionou-se manter tanto o valor da pressão do compressor como a distância de trabalho como constantes, respectivamente, 35 psi e 15 cm.

**Tabela 1:** Parâmetros utilizados nas amostras.

Parâmetros		Rotação do coletor (rpm)	
		55	250
Concentração da solução (%)	6	Amostras 1, 2, 8, 9, 10 e 13	Amostras 3, 4, 7, 11 e 12
	8	Amostra 5	Amostra 6

Após o uso da solução no aerógrafo e a confecção das mantas, estas foram cuidadosamente removidas do coletor rotativo, enroladas e guardadas em um dessecador, para não sofrerem degradação em contato com o ar.

### 3.2.2. Caracterização das Amostras

Inicialmente foi determinada a espessura das amostras empregando um micrômetro, e foram realizadas 5 medidas ( $n=5$ ), por amostra, para o cálculo do valor médio e desvio padrão. Em seguida, as amostras foram caracterizadas e descritas morfológicamente com o auxílio de uma câmera digital e microscópio eletrônico de varredura.

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material é recoberto com uma fina camada de metal pesado (ouro) e submetido a um feixe de elétrons que realiza a varredura da amostra. Os elétrons dispersos pela superfície do metal são coletados e projetados para gerar a imagem em um monitor. O feixe não penetra a amostra, fornecendo uma imagem da superfície. Esse aumento pode chegar a 100.000x (MADIGAN *et al.*, 2016).

### **3.2.3. Software ImageJ**

O *software* ImageJ é um programa de domínio público destinado ao processamento de imagens. Ele foi utilizado para analisar as imagens do MEV e fazer as medições da espessura das fibras e a análise de porosidade.

### **3.2.4. Determinação da Espessura das Fibras**

A determinação da espessura das fibras foi realizada empregando o *software* ImageJ a partir das imagens obtidas com o MEV. Primeiro, foram selecionadas as amostras cuja microscopia revelou a presença de fibras: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11 e 12. Em seguida, selecionou-se duas imagens de cada amostra, cada uma de uma região diferente, com aumento de 50 ou 40  $\mu\text{m}$  para serem analisadas pelo *software* ImageJ. Para cada imagem, foi feita a medição de espessura do máximo de fibras individuais possível pela análise visual e, subsequentemente, a análise do percentual de porosidade. Então, foi realizada a separação das fibras em intervalos de 100  $\mu\text{m}$  para analisar o perfil de distribuição.

### **3.2.5. Quantificação da Porosidade das Amostras**

Para quantificar o espaçamento entre as fibras (porosidade) foram utilizadas duas imagens de cada amostra, obtidas por MEV, como um padrão representativo da superfície dos materiais. As imagens foram tratadas utilizando o *software* ImageJ, convertidas em 8 bits, transformadas em branco com fundo preto para demonstrar o espaçamento entre as fibras e, posteriormente, esta área preta foi convertida em porcentagem e quantificada nas amostras.

Porosidade, neste estudo, foi considerado o espaçamento entre as fibras, formado, essencialmente, pelas porções de filme.

Não foi possível realizar os testes de citotoxicidade direta e por extrato devido à pandemia de COVID-19, que impossibilitou o acesso aos laboratórios.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Produção das Fibras**

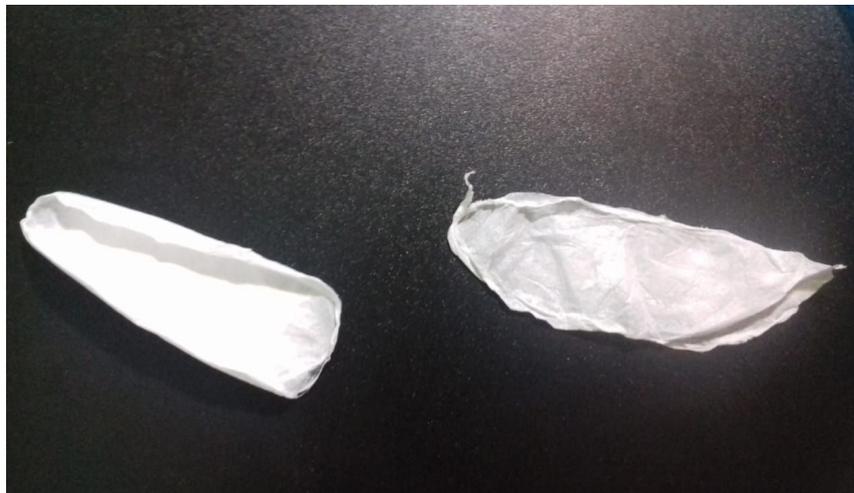
A ideia inicial do trabalho consistia em confeccionar as mantas nanofibrosas variando quatro parâmetros que pensou-se serem relevantes para a obtenção de amostras com diferentes morfologias. Esses parâmetros eram a concentração da solução (6% e 8%), a pressão do compressor (30 psi e 35 psi), a distância do bico do aerógrafo ao rotor (10 cm e 15 cm) e a rotação do rotor (55 rpm e 250 rpm). A combinação desses parâmetros levaria à produção de 16 grupos de amostras a serem analisadas.

**Figura 6:** Manta fibrosa de PLDLA recém produzida em um anteparo.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 7:** Manta fibrosa de PLDLA confeccionada com a sobreposição de muitas camadas (esquerda) e poucas camadas (direita).



Fonte: Do próprio autor.

A partir de testes preliminares foi verificado que a pressão e distância de trabalho, na faixa de valores previamente planejadas, não apresentaram grande influência na morfologia das amostras. Assim sendo, foram variados apenas os parâmetros de concentração da solução e de rotação do coletor.

A velocidade de rotação maior produz, em teoria, fibras com maior alinhamento, enquanto que a velocidade menor diminui o alinhamento. Como discutido por SIMBARA *et al.* 2018, uma velocidade de rotação de 300 rpm já é suficiente para alcançar um grau satisfatório de alinhamento de fibra com a FSS, enquanto que na eletrofição esse mesmo alinhamento é alcançado com, pelo menos, 1000 rpm (SIMBARA *et al.*, 2018).

Tanto o aumento da concentração da solução quanto o aumento da pressão do compressor levam a um aumento no calibre das fibras. A literatura recomenda que o diâmetro das fibras que constituem o *scaffold* seja da mesma ordem de grandeza das proteínas presentes na matriz extracelular do tecido em questão (HELL *et al.*, 2018).

Foi incluída também uma amostra produzida com um polímero PLDLA de peso molecular distinto ( $M_w=143.000$  g/mol), em contraste com o que estava sendo usado ( $M_w=253.026$  g/mol). Na contagem final, foram obtidas 8 amostras com os parâmetros antigos, 4 com os parâmetros novos e 1 com o peso molecular do polímero diferente, totalizando 13 amostras.

A tabela 2 apresenta os valores médios e desvios-padrão para cada uma das amostras em estudo.

**Tabela 2:** Tabela com as espessuras das amostras.

<b>Amostra</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1	c=6%, p=35 psi, d=15 cm e r=55 rpm (~40 mL)	23,8 $\pm$ 5,57
2	c=6%, p=35 psi, d=15 cm e r=55 rpm (~20 mL)	48,4 $\pm$ 9,83
3	c=6%, p=35 psi, d=15 cm e r=250 rpm (~40 mL)	36,8 $\pm$ 3,88
4	c=6%, p=35 psi, d=15 cm e r=250 rpm (~20 mL)	75,0 $\pm$ 2,48
5	c=8%, p=35 psi, d=15 cm e r=55 rpm	22,8 $\pm$ 3,56
6	c=8%, p=35 psi, d=15 cm e r=250 rpm	117,6 $\pm$ 4,50
7	c=6%, p=35 psi, d=10 cm e r=250 rpm	36,2 $\pm$ 5,59
8	c=6%, p=35 psi, d=10 cm e r=55 rpm	23,8 $\pm$ 5,61
9	c=6%, p=30 psi, d=15 cm e r=55 rpm	8,4 $\pm$ 2,79
10	c=6%, p=30 psi, d=10 cm e r=55 rpm	6,6 $\pm$ 3,20
11	c=6%, p=30 psi, d=10 cm e r=250 rpm	30,0 $\pm$ 25,33
12	c=6%, p=30 psi, d=15 cm e r=250 rpm	4,4 $\pm$ 3,25
13	c=6%, p=35 psi, d=15 cm e r=55 rpm (S-17B)	24,2 $\pm$ 5,06

Observa-se que a espessura das amostras variou entre 4 e 120 micra. Essa grande variação deveu-se à diferença na quantidade de solução depositada sobre o coletor. Ao observar que as primeiras amostras obtidas estavam muito finas, dificultando o manuseio, optou-se por aumentar a espessura do material com a

deposição de mais camadas, isto é, aumentando-se o volume de solução depositado, o que foi feito depositando maior volume de solução na mesma amostra.

Dentre as considerações relevantes que se pode fazer quanto às espessuras, podemos citar que as amostras com os mesmos parâmetros mas maior volume de material apresentaram, paradoxalmente, menor espessura em comparação com suas equivalentes de menor deposição. Isso pode ter ocorrido pela tendência do material de se desprender do coletor e ficar em suspensão dentro da capela. Como o coletor ficou rotacionando por mais tempo, essa é uma hipótese plausível. Outra observação digna de nota é o desvio padrão extremamente alto da amostra 11, que pode ter ocorrido por conta de algum erro de medição ou por variações muito bruscas de espessura em porções diferentes da mesma amostra.

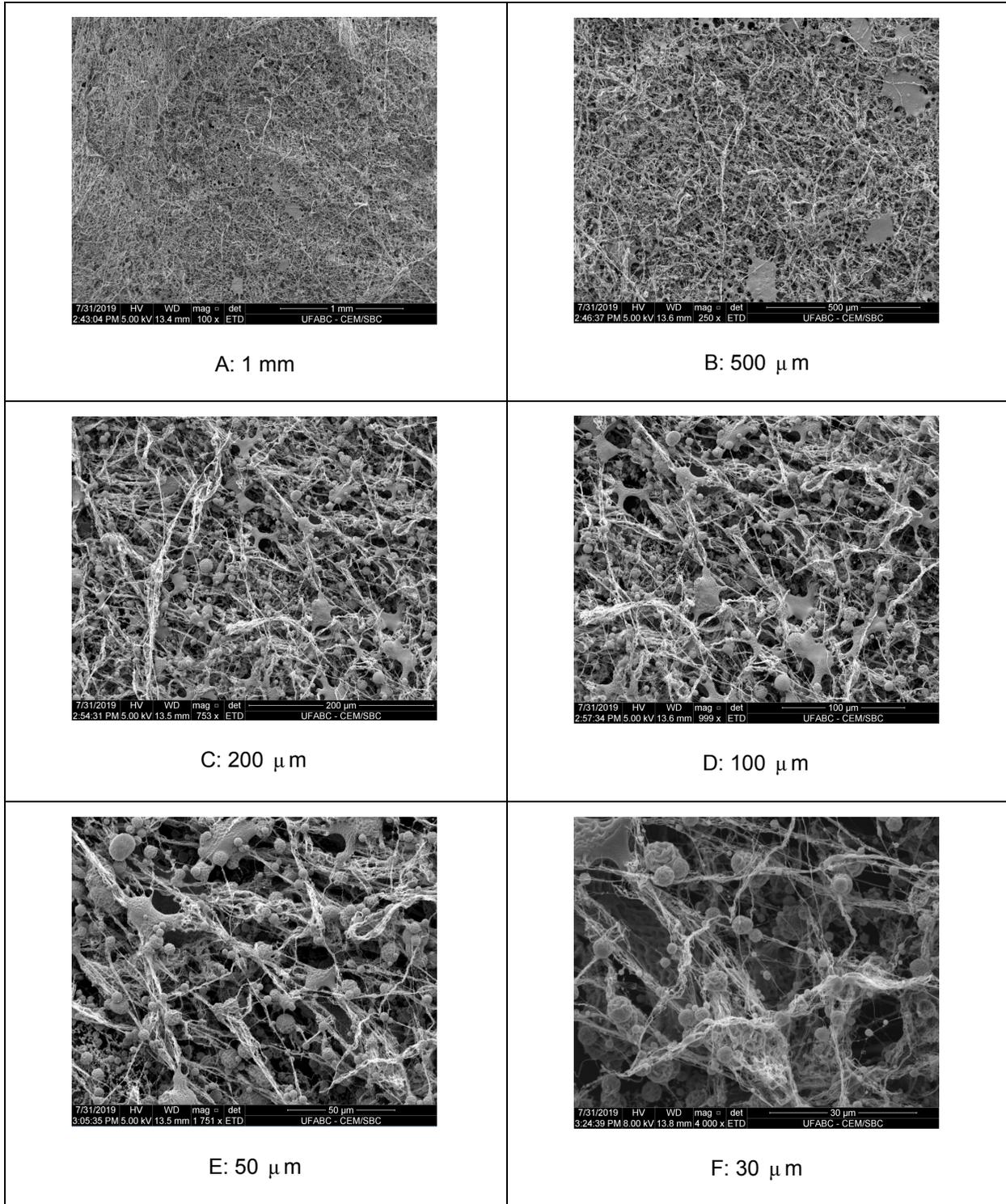
As figuras 8 e 9 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm ( $\sim 40$  mL).

**Figura 8:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm ( $\sim 40$  mL).



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 9:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm ( $\sim 40$  mL).

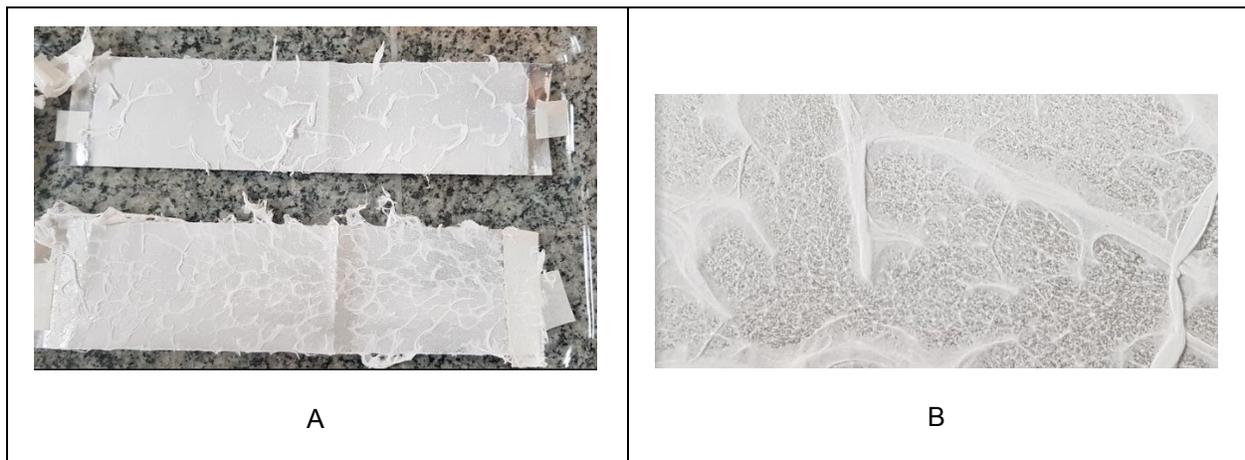


Fonte: Do próprio autor.

Verifica-se que esta amostra apresenta muitas fibras visíveis tanto macroscópica quanto microscopicamente, poucas regiões com formação de filme e algumas partículas.

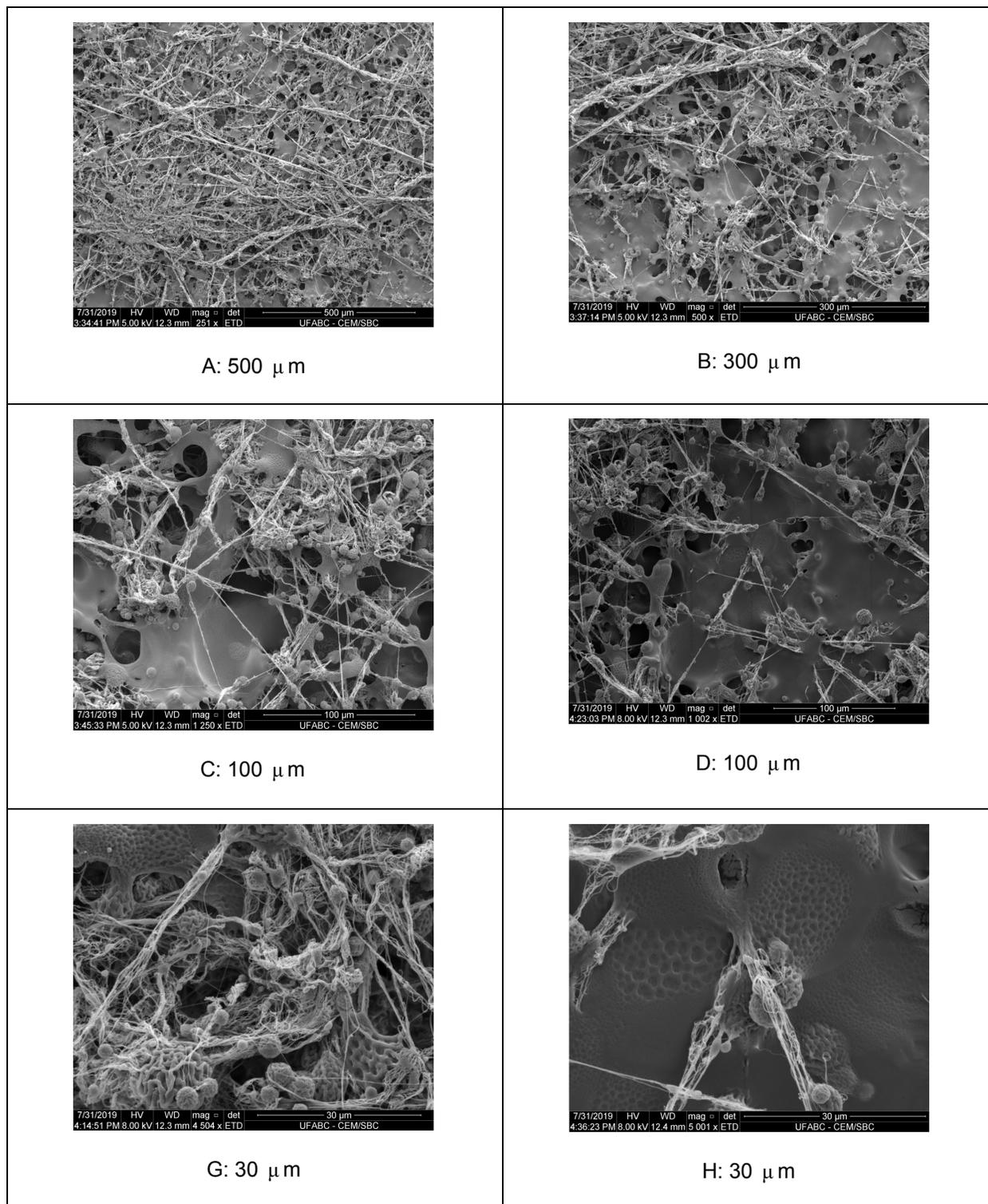
As figuras 10 e 11 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm ( $\sim 20$  mL).

**Figura 10:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm ( $\sim 20$  mL).



Fonte: Do próprio autor

**Figura 11:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm ( $\sim 20$  mL).



Fonte: Do próprio autor.

Esta amostra apresenta muitas fibras macroscopicamente, entretanto, as imagens de MEV evidenciam tanto regiões fibrosas quanto regiões extensas de filme e algumas partículas. Nota-se que os parâmetros utilizados são os mesmos da amostra anterior, sendo a única diferença a menor deposição de material, neste caso.

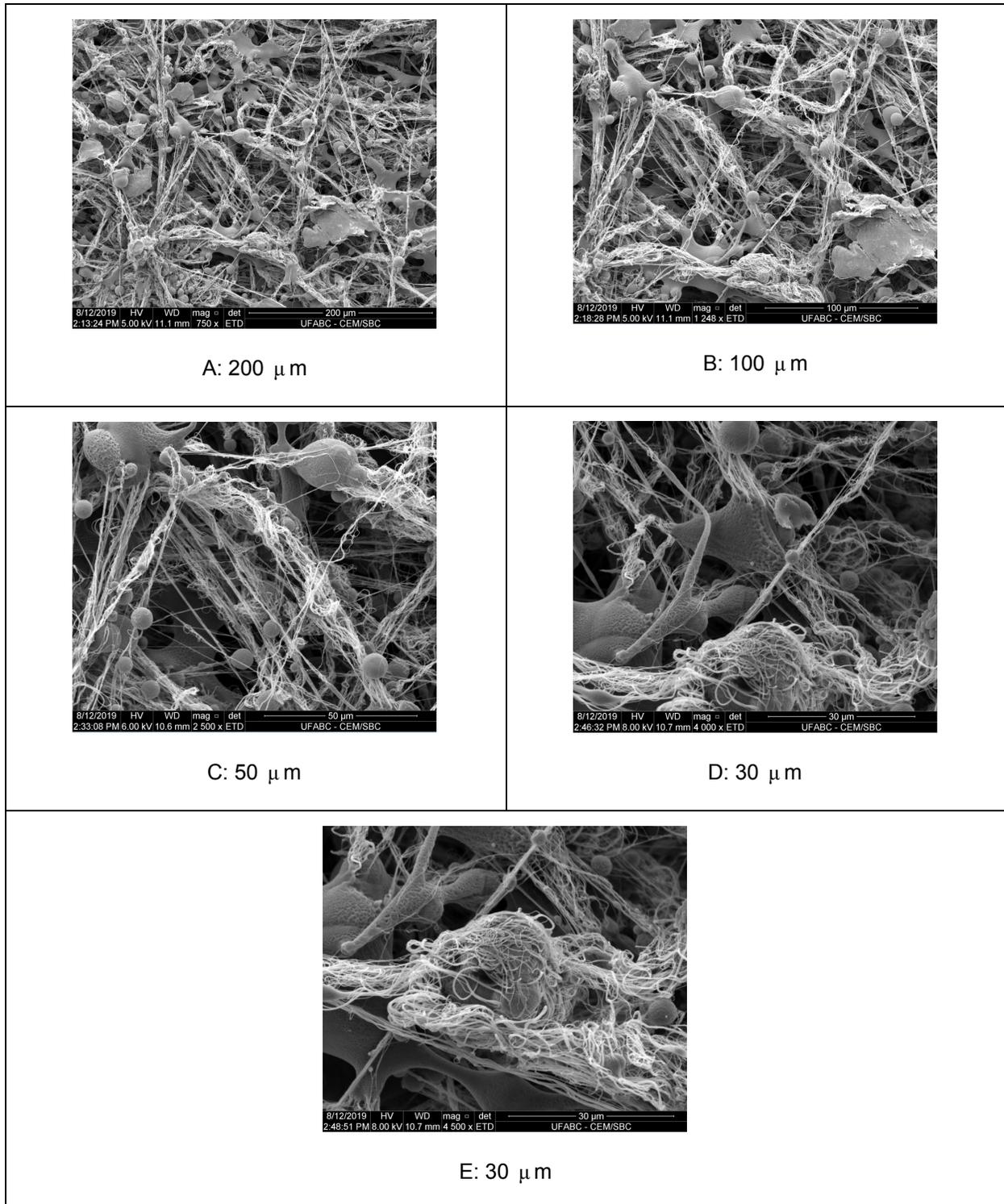
As figuras 12 e 13 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm ( $\sim 40$  mL).

**Figura 12:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm ( $\sim 40$  mL).



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 13:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm ( $\sim 40$  mL).



Fonte: Do próprio autor.

Esta é uma das amostras com maior visibilidade de fibras a olho nu, forrando completamente o papel laminado com uma camada relativamente espessa. No MEV observa-se muitas fibras e partículas e poucas regiões de filme.

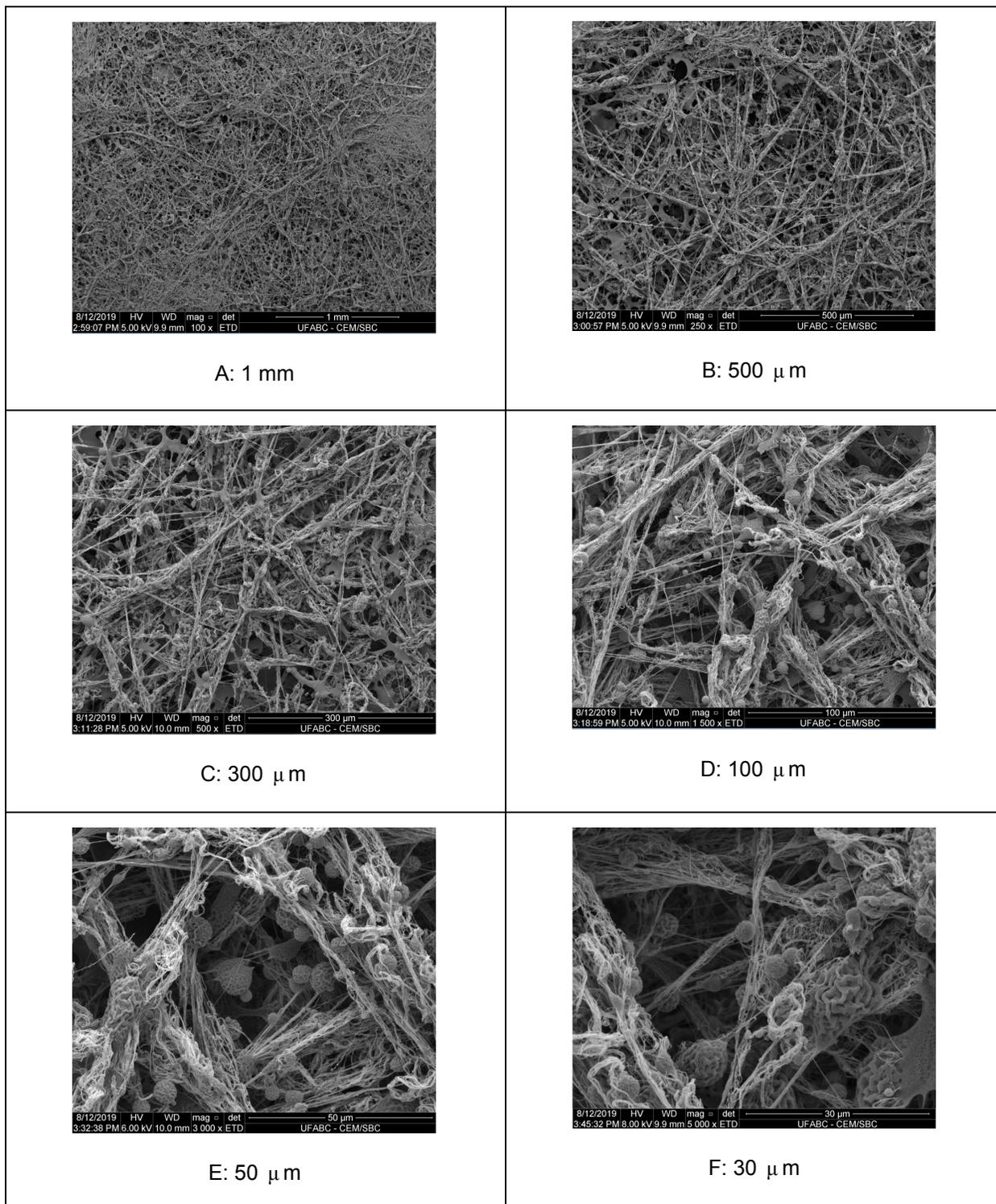
As figuras 14 e 15 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm ( $\sim 20$  mL).

**Figura 14:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm ( $\sim 20$  mL).



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 15:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm ( $\sim 20$  mL).

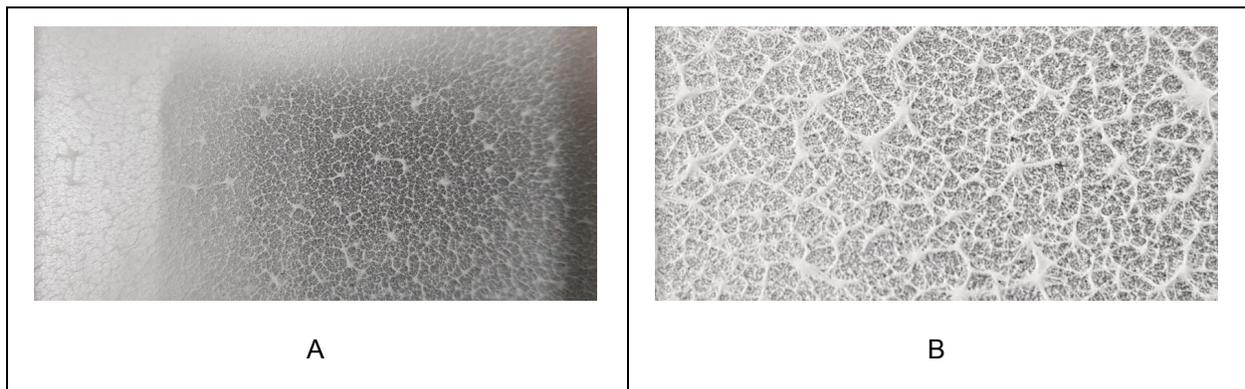


Fonte: Do próprio autor.

Esta amostra é essencialmente igual à anterior, com a diferença de terem sido depositadas menos camadas de solução, da imagem no MEV apresentar menos partículas e não evidenciar nenhuma região de filme.

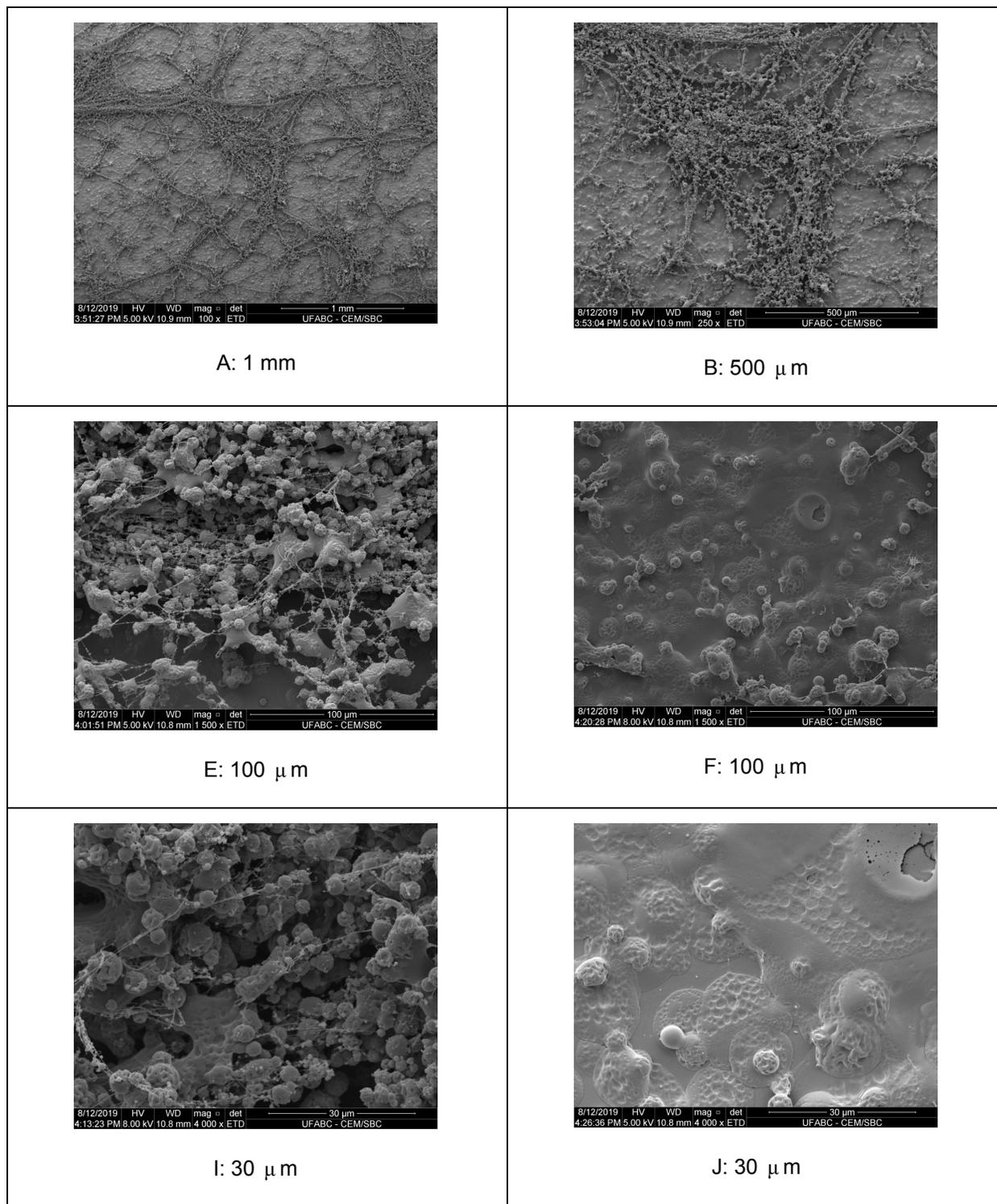
As figuras 16 e 17 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=8\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm.

**Figura 16:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=8\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 17:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=8\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm.

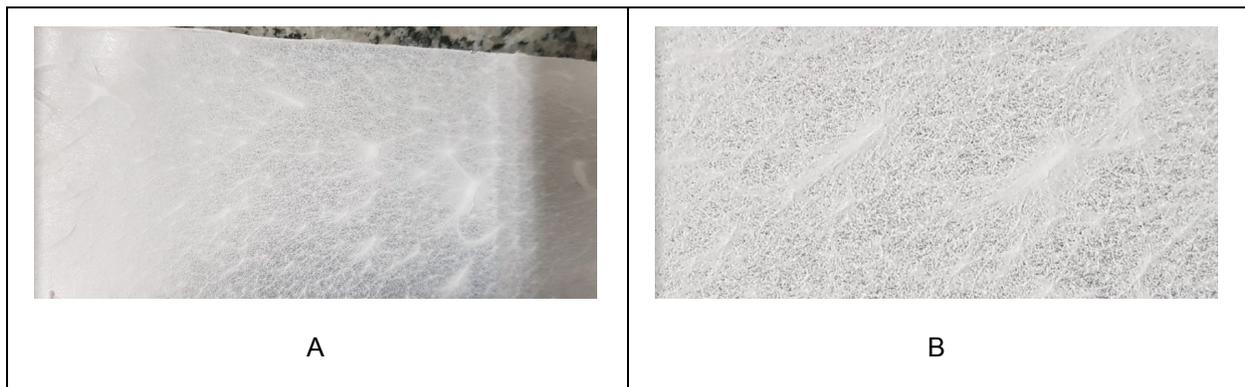


Fonte: Do próprio autor.

Macroscopicamente, é possível observar poucas fibras e grandes regiões com filme fino. No MEV, pode-se constatar as vastas regiões de filme e, no lugar de fibras, muitas partículas aglomeradas.

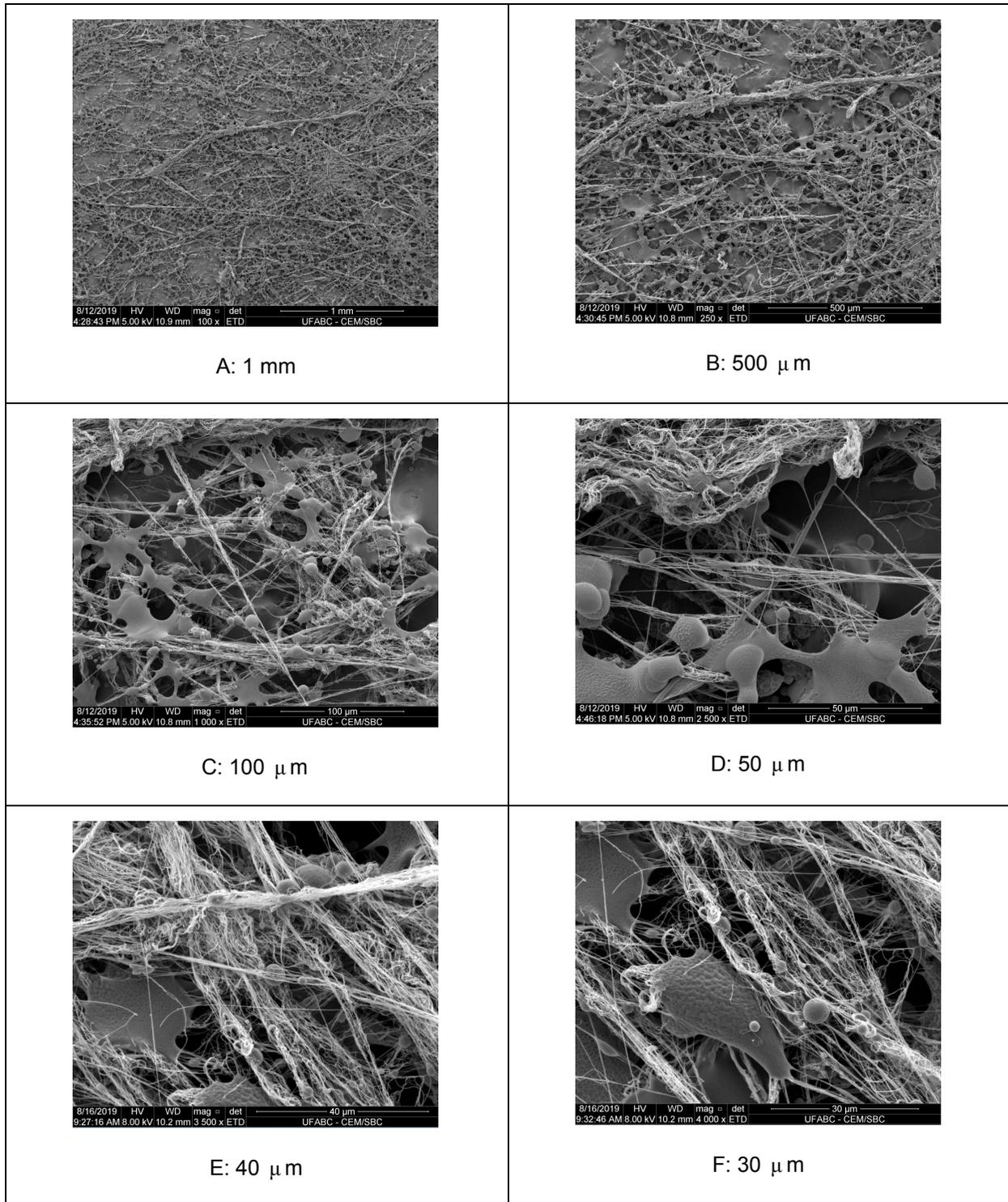
As figuras 18 e 19 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=8\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm.

**Figura 18:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=8\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 19:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=8\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm.

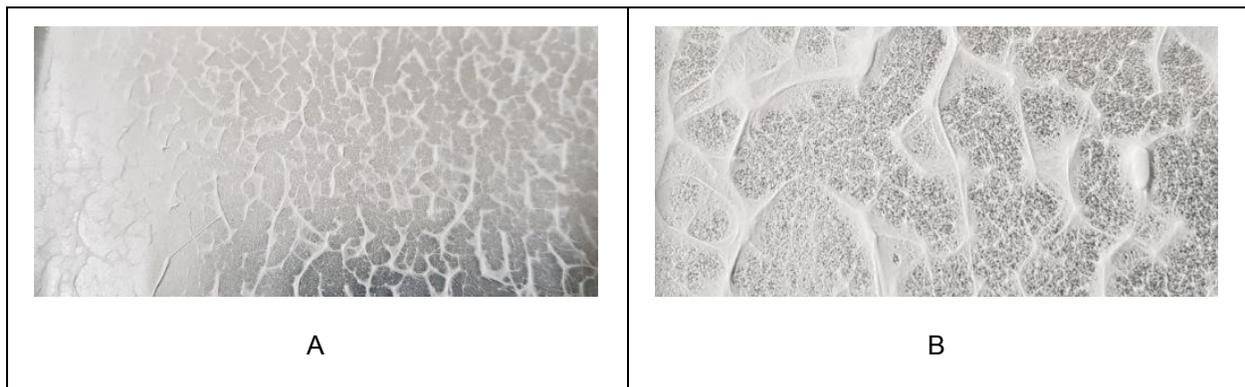


Fonte: Do próprio autor.

Macroscopicamente, observa-se algumas regiões de fibra e finas porções de filme. No MEV pode-se verificar a predominância de fibras, mas também filme e algumas partículas.

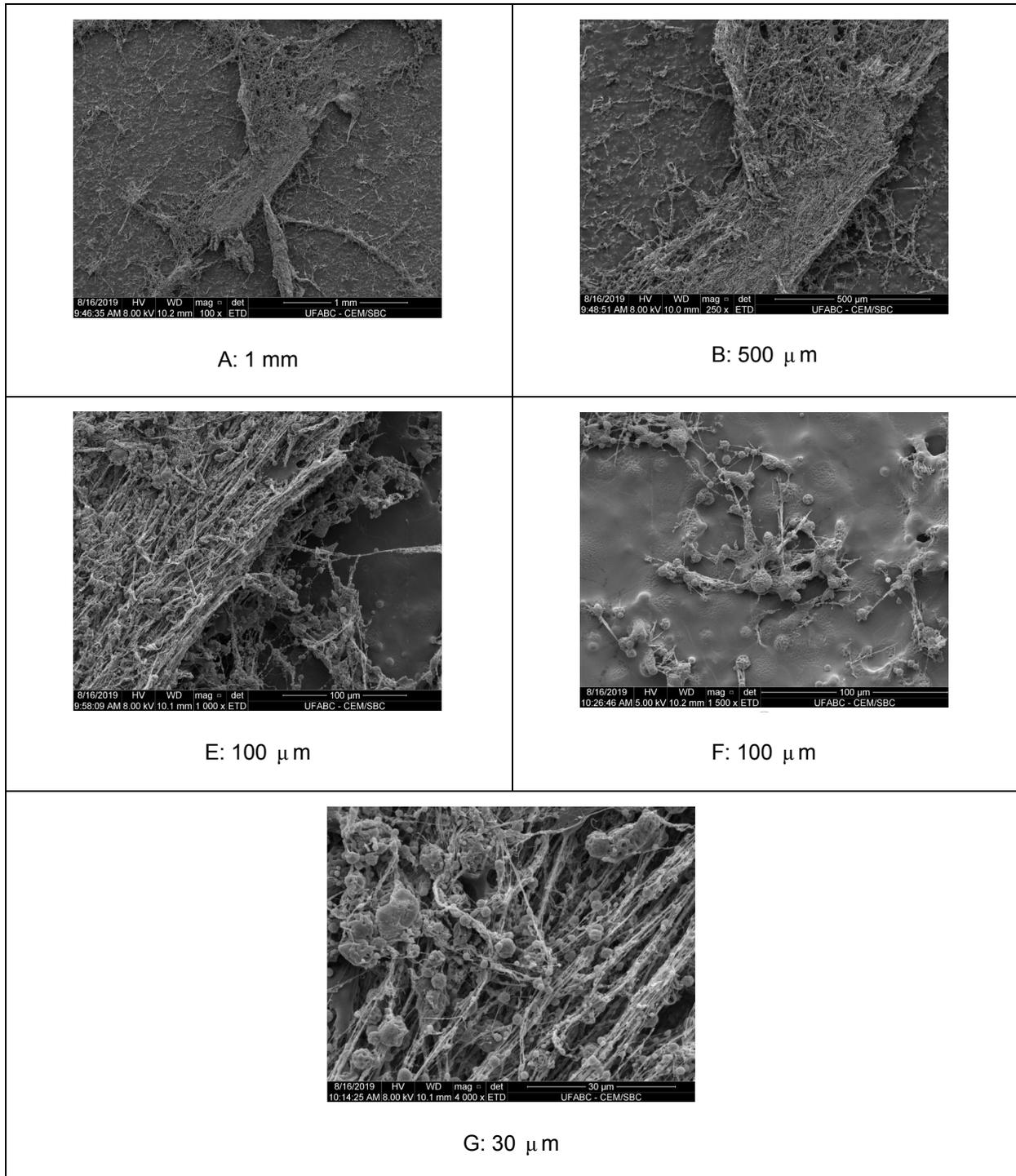
As figuras 20 e 21 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=10$  cm e  $r=250$  rpm.

**Figura 20:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=10$  cm e  $r=250$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 21:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=10$  cm e  $r=250$  rpm.

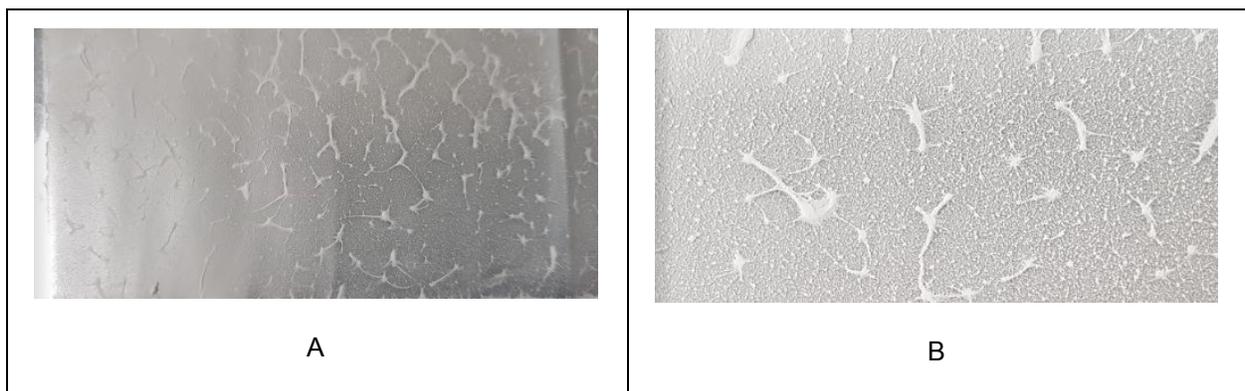


Fonte: Do próprio autor.

Esta amostra apresenta regiões bem concentradas de fibras e regiões de filme extremamente finas. No MEV, essas regiões distintas ficam bem evidentes e contrastantes. No entanto, apresenta poucas partículas.

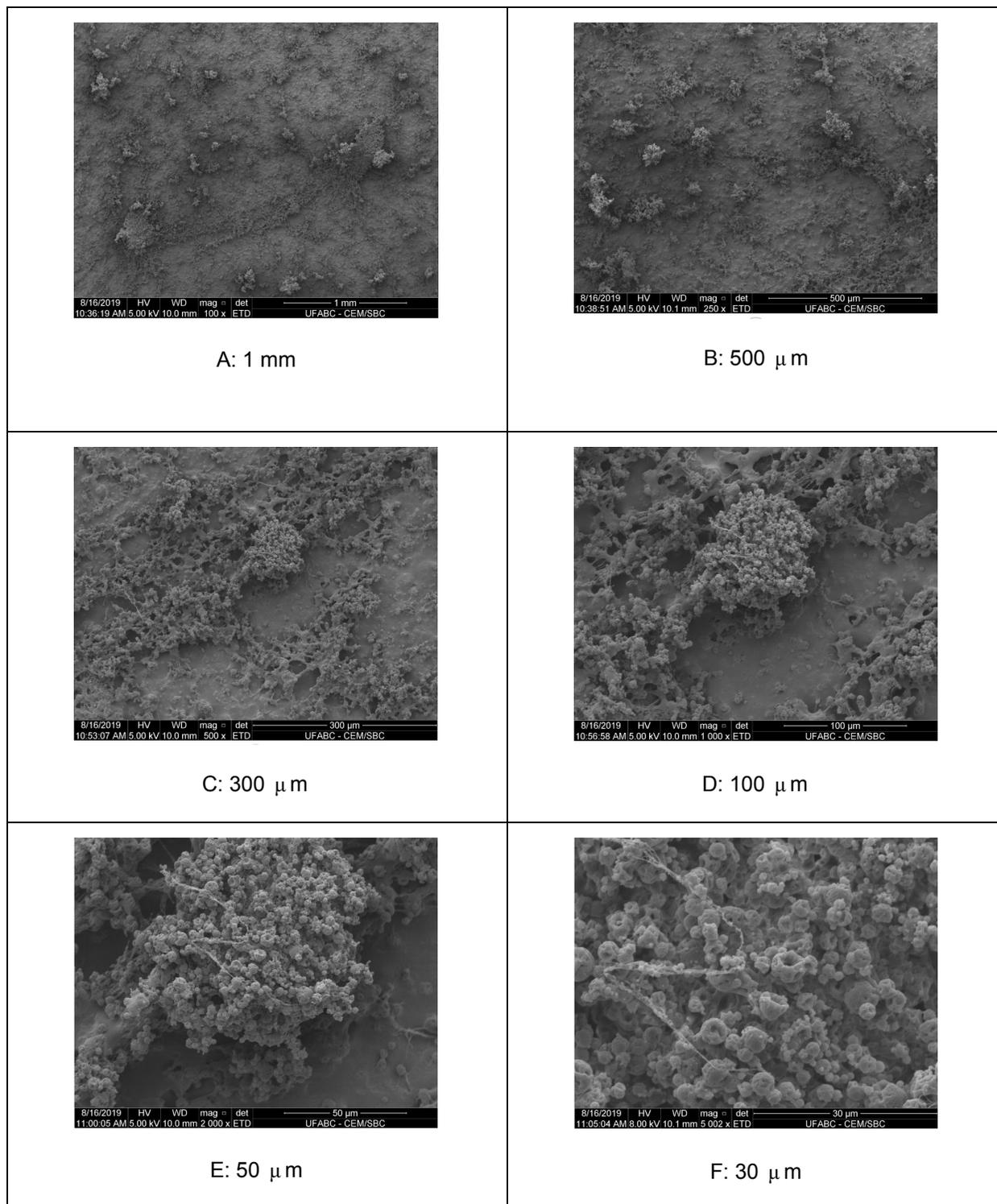
As figuras 22 e 23 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=10$  cm e  $r=55$  rpm.

**Figura 22:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=10$  cm e  $r=55$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 23:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=10$  cm e  $r=55$  rpm.

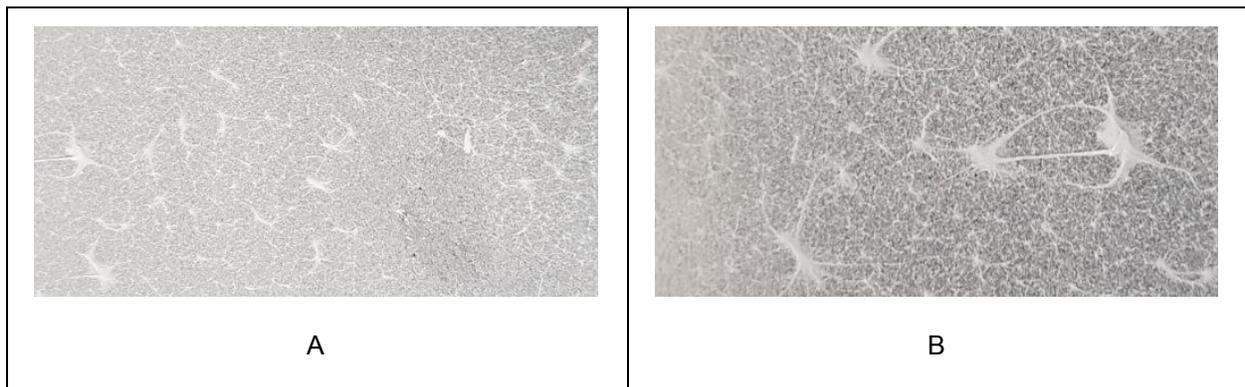


Fonte: Do próprio autor.

Essa amostra apresenta, visualmente, menos regiões de fibras e menos extensas, enquanto que a maior porção corresponde a um filme fino. O MEV confirma a ausência total de fibras e evidencia regiões com aglomerados de partículas.

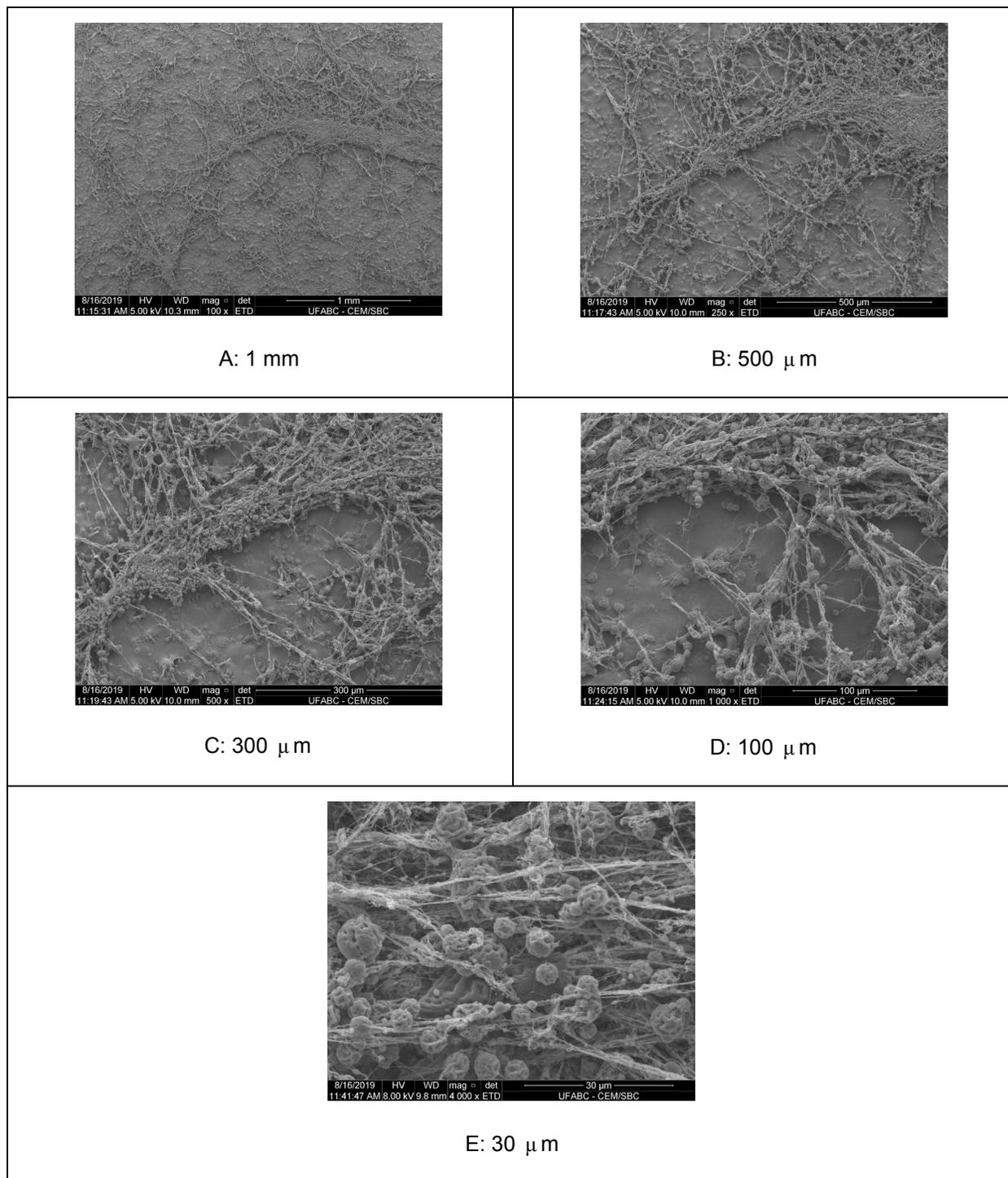
As figuras 24 e 25 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm.

**Figura 24:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 25:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

Esta amostra é similar à anterior, macroscopicamente, porém, a microscopia revela regiões bem concentradas de fibras.

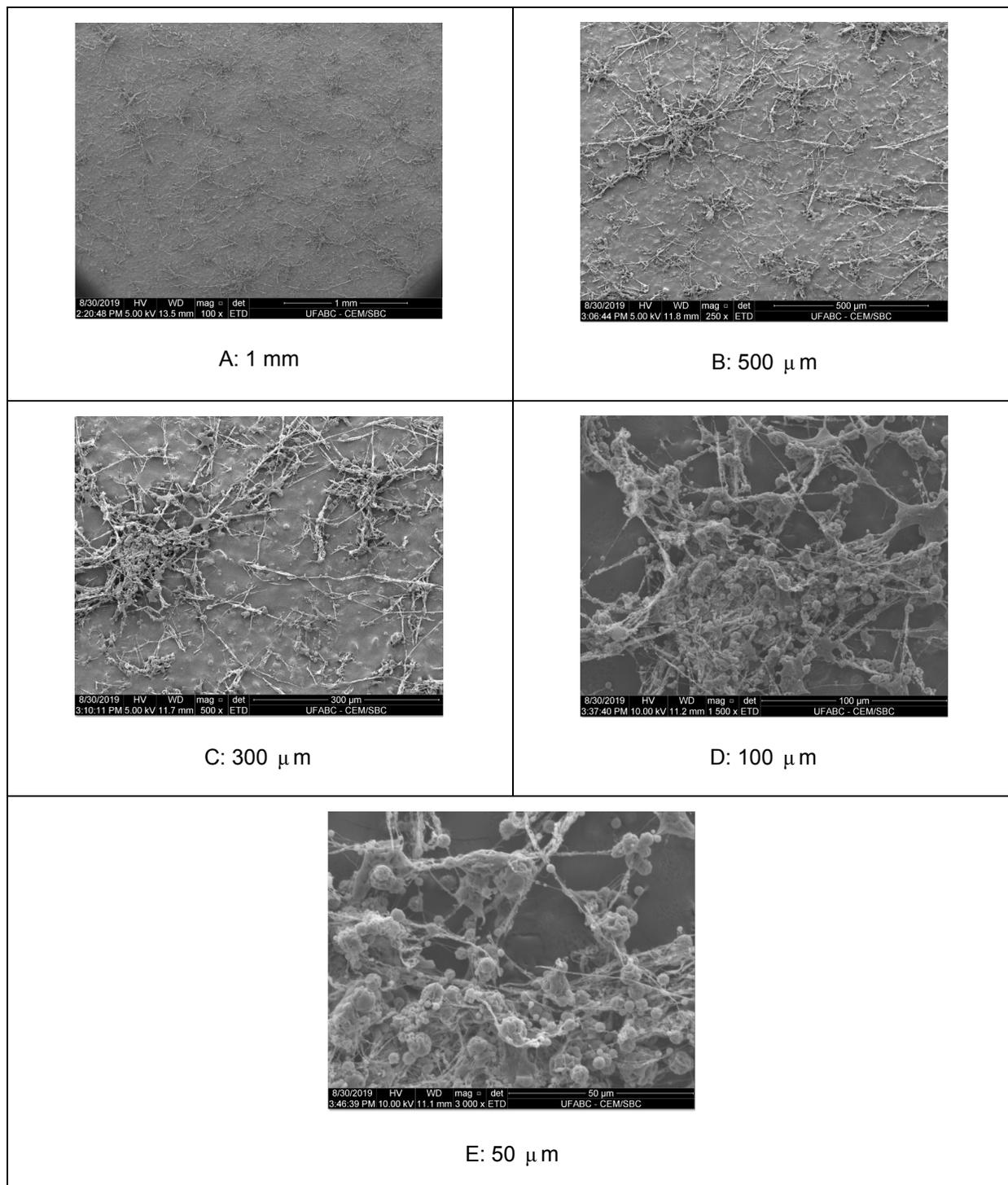
As figuras 26 e 27 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=10$  cm e  $r=55$  rpm.

**Figura 26:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=10$  cm e  $r=55$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 27:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=10$  cm e  $r=55$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

Esta é uma típica amostra fina com poucas camadas de solução cuja microscopia reflete a expectativa que se tem, a olho nu, de uma concentração fibrosa baixa e esparsa.

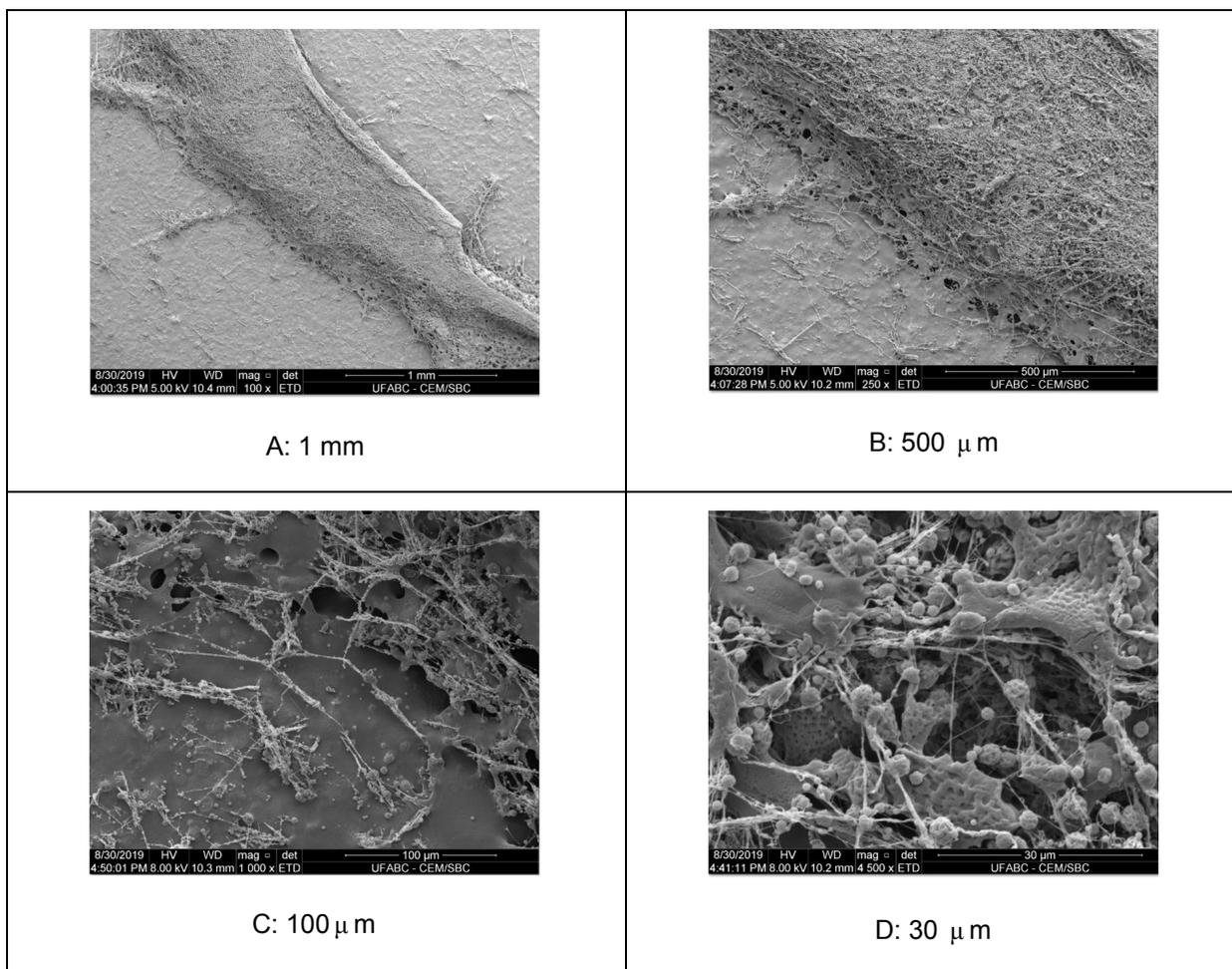
As figuras 28 e 29 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=10$  cm e  $r=250$  rpm.

**Figura 28:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=10$  cm e  $r=250$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 29:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=10$  cm e  $r=250$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

Aqui há um contraste bem interessante entre uma porção de fibras salientes, contínuas e uniformes e a região rente e fina de filme.

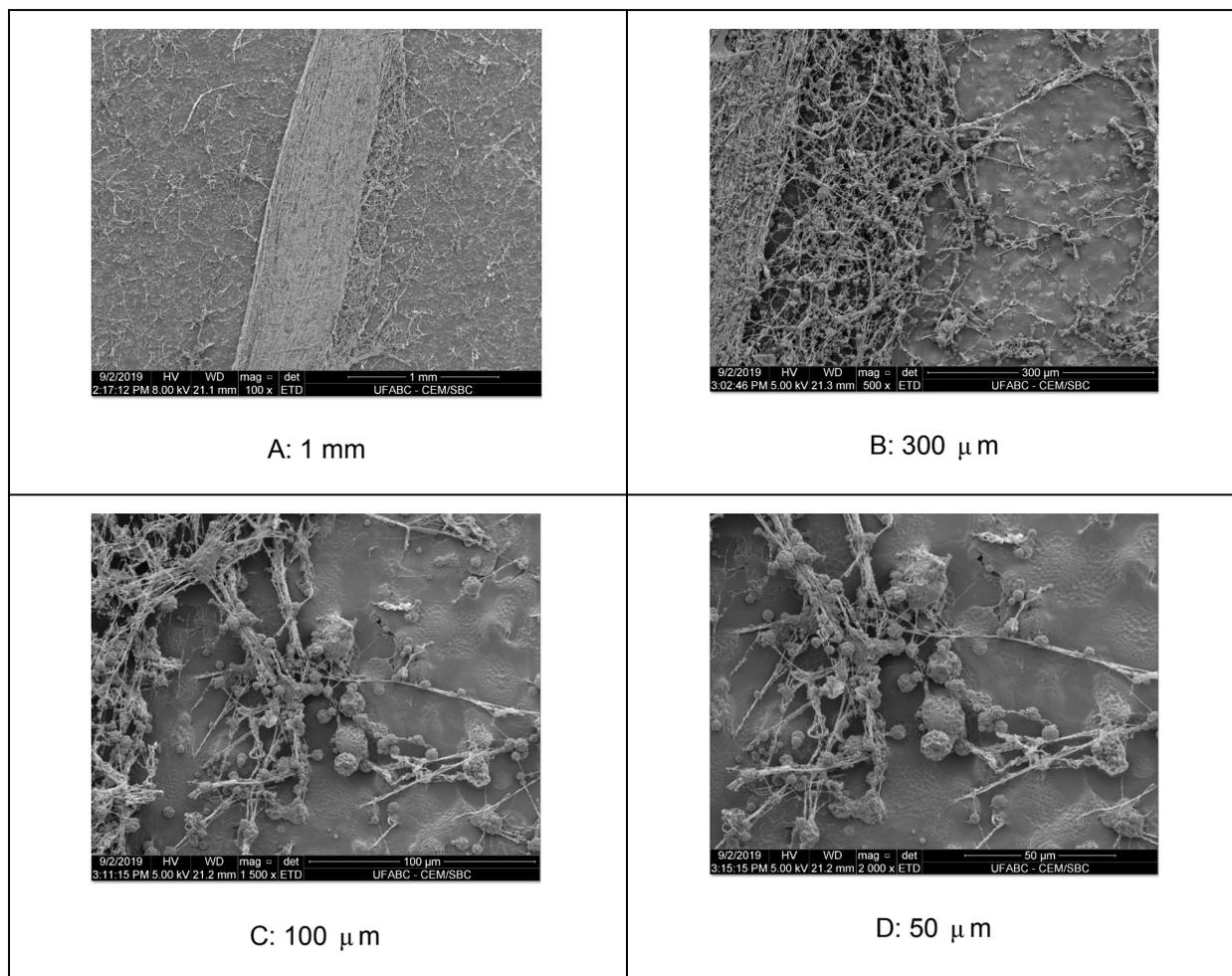
As figuras 30 e 31 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm.

**Figura 30:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 31:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=30$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

Do mesmo modo que no caso anterior, a porção de fibras grossas e bem alinhadas se destaca em meio ao filme predominante da amostra.

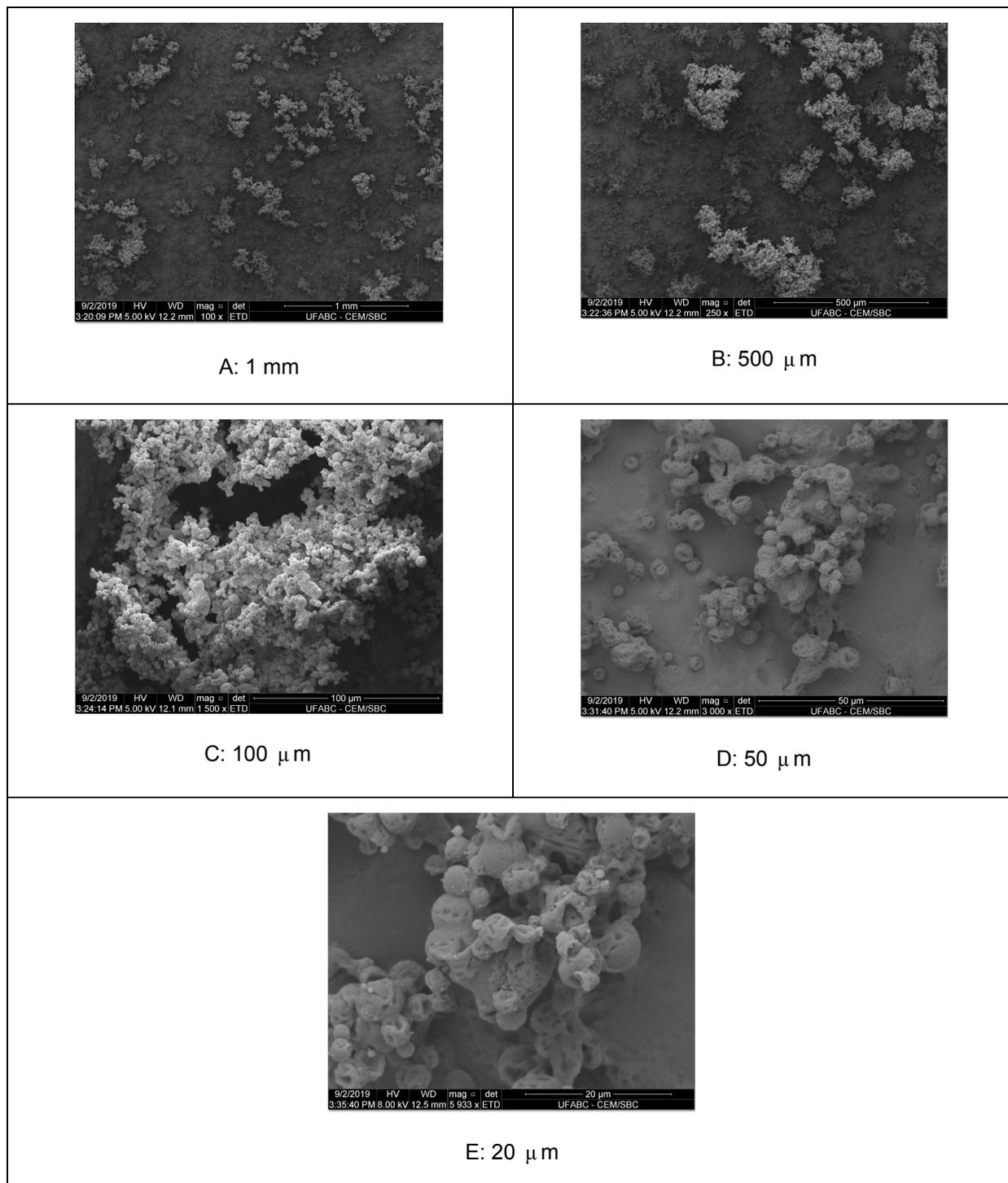
As figuras 32 e 33 apresentam as imagens macro e microscópicas das amostras fibrosas de PLDLA obtidas empregando os parâmetros  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm (S-17B).

**Figura 32:** Imagem macroscópica da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm (S-17B).



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 33:** Imagens por MEV da amostra obtida na condição  $c=6\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=55$  rpm (S-17B).



Fonte: Do próprio autor.

Esta é, sem dúvida, a mais discrepante das amostras, já que é resultante de uma solução composta por um polímero de PLDLA com peso molecular maior do que o S-18B usado nas amostras anteriores. Podemos constatar a completa ausência de fibras e o padrão macroscópico de pequenas esferas que, ao microscópio, aparecem como grandes aglomerados difusos de partículas intercaladas por uma fina camada de filme.

A tabela 3 apresenta um resumo dos resultados observados a partir das imagens das amostras.

**Tabela 3:** Tabela do Excel com as características microestruturais das amostras.

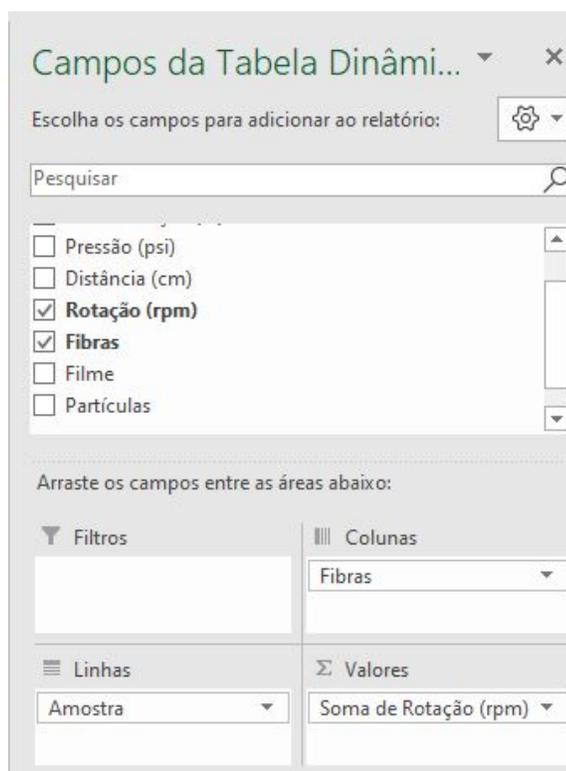
Amostra	Concentração (%)	Pressão (psi)	Distância (cm)	Rotação (rpm)	Fibras	Filme	Partículas
1	6	35	15	55	muito	pouco	pouco
2	6	35	15	55	muito	muito	pouco
3	6	35	15	250	muito	pouco	muito
4	6	35	15	250	muito	nada	muito
5	8	35	15	55	nada	muito	muito
6	8	35	15	250	muito	pouco	pouco
7	6	35	10	250	muito	muito	pouco
8	6	35	10	55	nada	muito	muito
9	6	30	15	55	muito	muito	pouco
10	6	30	10	55	pouco	muito	muito
11	6	30	10	250	muito	muito	pouco
12	6	30	15	250	muito	muito	pouco
13	6	35	15	55	nada	muito	muito

A partir destes resultados foram montadas as tabelas 4 e 5, usando o recurso de tabela dinâmica do Excel e, a partir destas foi possível demonstrar correlação entre a velocidade de rotação do coletor rotativo e a formação de fibras nas amostras.

Todas as amostras confeccionadas a 250 rpm aumentaram a captação de fibras, independentemente dos outros parâmetros. Entretanto, não foram observadas outras correlações, nem mesmo com a concentração da solução. É possível que o número de amostras seja muito pequeno para qualquer relevância estatística e que o caráter

artesanal da técnica sofra variações significativas não relacionadas aos parâmetros pré-definidos.

**Tabela 4:** Tabela com os campos selecionados de rotação e fibras para gerar a tabela dinâmica.



**Tabela 5:** Tabela dinâmica do Excel evidenciando a correlação da velocidade de rotação com a formação de muitas fibras.

Soma de Rotação (rpm)	Rótulos de Coluna			
Rótulos de Linha	▼ muito	nada	pouco	Total Geral
1	55			55
2	55			55
3	250			250
4	250			250
5		55		55
6	250			250
7	250			250
8		55		55
9	55			55
10			55	55
11	250			250
12	250			250
13		55		55
<b>Total Geral</b>	<b>1665</b>	<b>165</b>	<b>55</b>	<b>1885</b>

Finalmente, foi possível constatar que a técnica de fiação por sopro utilizando o método do *airbrushing* gera amostras muito interessantes, entretanto, por se tratar de um processo manual, com características artesanais, exibe muita dificuldade para controlar a espessura das amostras e garantir sua homogeneidade. Além disso, durante o sopro perde-se muito material, que acaba ficando em suspensão na capela de fluxo laminar e não adere ao anteparo.

Com certeza, boa parte desses problemas seria solucionada com a automatização da técnica, assegurando maior qualidade das amostras e reprodutibilidade do método.

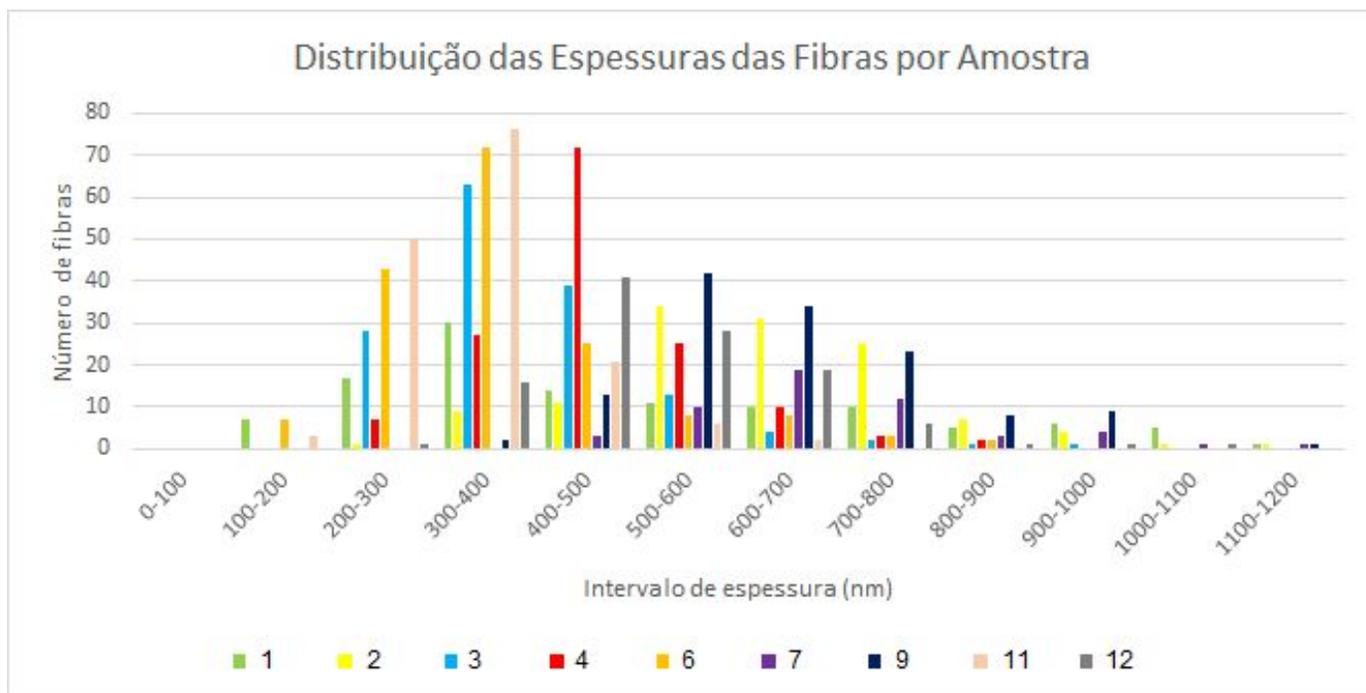
## 4.2. Espessura das Fibras

Os dados da Tabela 6 e da Figura 34 determinam a distribuição de espessuras das fibras no intervalo de 100 a 1200 nm, estando a maior concentração no intervalo de 200 a 800 nm.

**Tabela 6:** Tabela da distribuição do número de fibras medida por intervalo de espessura, com as respectivas soma, média, mediana e amplitude de dispersão.

Distribuição (nm)	Amostras									
	1	2	3	4	6	7	9	11	12	
0-100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100-200	7	0	0	0	7	0	0	3	0	
200-300	17	1	28	7	43	0	0	50	1	
300-400	30	9	63	27	72	0	2	76	16	
400-500	14	11	39	72	25	3	13	21	41	
500-600	11	34	13	25	8	10	42	6	28	
600-700	10	31	4	10	8	19	34	2	19	
700-800	10	25	2	3	3	12	23	0	6	
800-900	5	7	1	2	2	3	8	0	1	
900-1000	6	4	1	0	0	4	9	0	1	
1000-1100	5	1	0	0	0	1	0	0	1	
1100-1200	1	1	0	0	0	1	1	0	0	
SOMA	116	124	151	146	168	53	132	158	114	
MÉDIA (nm)	504,03	626,54	422,22	463,10	366,98	703,51	648,55	336,25	529,90	
MEDIANA (nm)	421,5	619	398	458	370	678	649	330	495	
Amplitude (nm)	1000	600	400	500	600	300	600	400	500	

**Figura 34:** Gráfico da distribuição de espessura das fibras por amostra.



Fonte: Do próprio autor.

A figura 35 mostra apenas uma amostra, pois é a única representante da concentração de 8% que apresentou fibras para serem mensuradas. Sua distribuição ficou concentrada na região intermediária de 200 a 500 nm.

**Figura 35:** Gráfico da distribuição de espessura da única amostra de  $c=8\%$  com fibras ( $c=8\%$ ,  $p=35$  psi,  $d=15$  cm e  $r=250$  rpm).



Fonte: Do próprio autor.

É interessante notar na figura 36 que os dois pares de amostra com os parâmetros iguais, cuja única diferença é a quantidade de material depositado, não coincidiram na distribuição das fibras por intervalo. Nos dois casos, as amostras com deposição de ~40 mL (1 e 3) apresentaram mais fibras menores do que as suas correspondentes de ~20 mL (2 e 4).

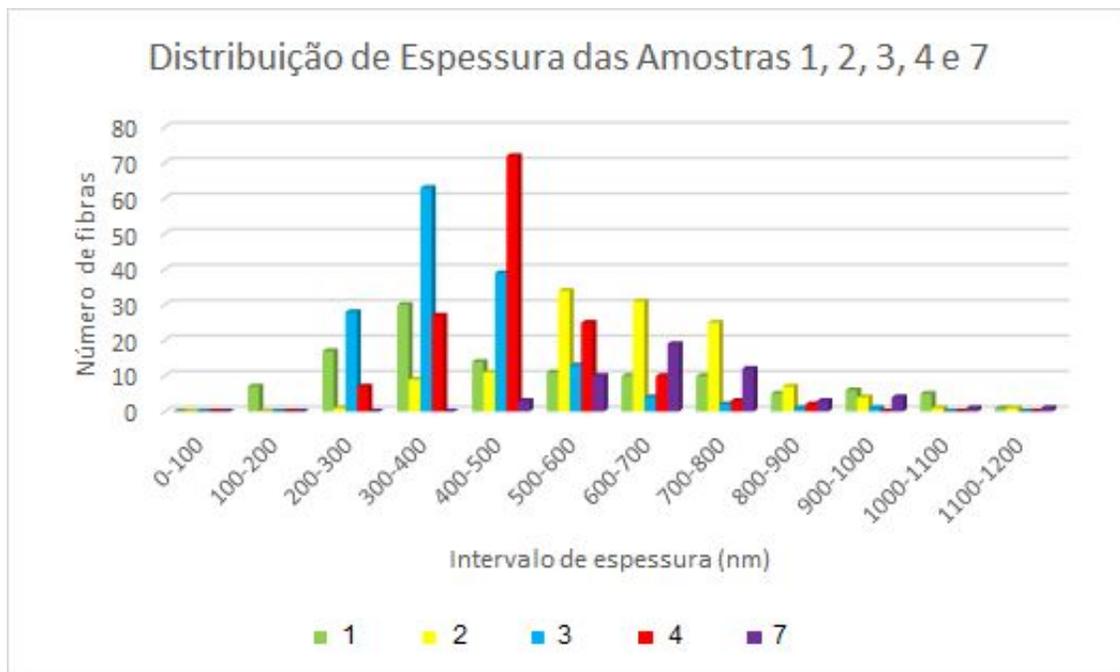
Isso talvez ocorra pelo fato da trama mais espessa das amostras 1 e 3 facilitar a individualização de fibras menos calibrosas no momento da medição, já que torna-se mais evidente que as aparentes fibras mais espessas são, na verdade, compostas de fibras menores agrupadas. Como a aproximação das amostras espessas é maior, esse tipo de observação torna-se possível.

Outra observação que se faz das amostras iguais é que as produzidas com  $r=55$ rpm (1 e 2), apresentaram distribuição mais dispersa no espectro de espessuras do que as produzidas com  $r=250$  rpm (3 e 4). Estas últimas formam grandes picos, ao

redor dos quais ficaram suas médias (422,22 e 463,10 nm, respectivamente), como indicado na tabela 6.

Talvez isso aconteça porque a rotação maior além de aumentar a captação de fibras e, em tese, melhorar seu alinhamento, também seja capaz de padronizar, de certa forma, a espessura, impedindo a captação de fibras muito finas e muito grossas.

**Figura 36:** Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 5 amostras com  $c=6\%$  e  $p=35$  psi.



Fonte: Do próprio autor.

A figura 37 sintetiza a distribuição de espessuras das fibras das três amostras confeccionadas a  $p=30$  psi. Nota-se, claramente, que as amostras 9 e 12, que diferem somente na velocidade de rotação do anteparo (55 e 250 rpm, respectivamente), possuem distribuição muito semelhante, indicando que este fator não foi relevante para a espessura das fibras.

**Figura 37:** Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 3 amostras com  $c=6\%$  e  $p=30$  psi.



Fonte: Do próprio autor.

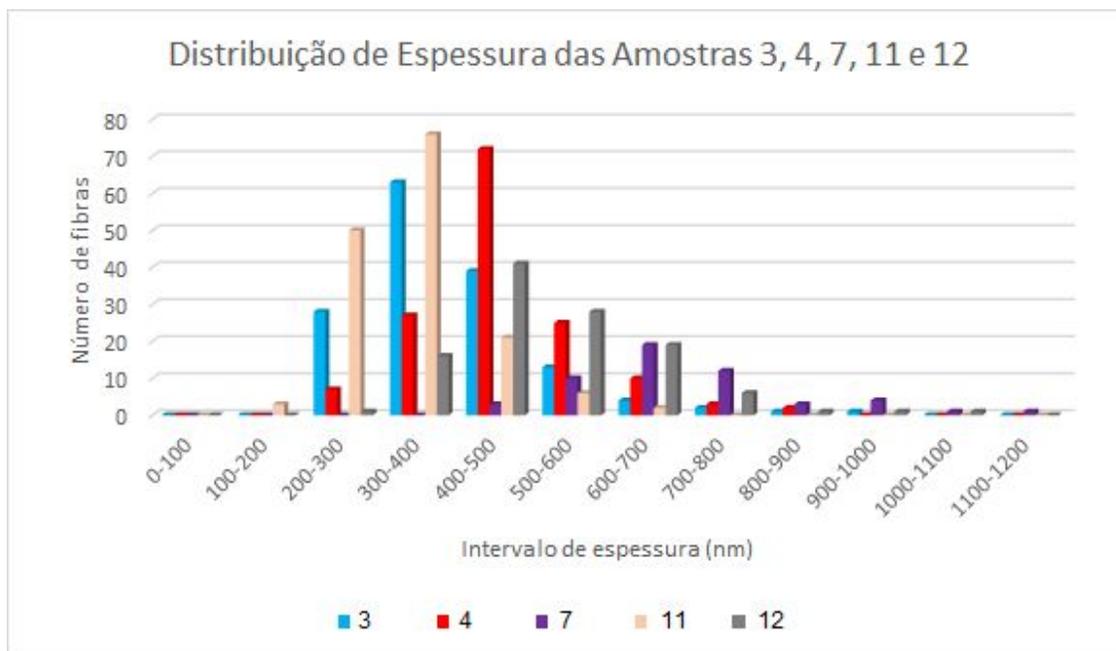
A observação que se fez a respeito da maior distribuição dos dados de espessura das amostras 1 e 2 pode ser generalizada para todas as amostras confeccionadas a 55 rpm em comparação com as amostras de 250 rpm, como observado na distribuição das amostras que leva a velocidade de rotação em consideração (figuras 38 e 39).

**Figura 38:** Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 3 amostras com  $c=6\%$  e  $r=55$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

**Figura 39:** Gráfico comparativo da distribuição de espessura das 5 amostras com  $c=6\%$  e  $r=250$  rpm.



Fonte: Do próprio autor.

### 4.3. Porosidade

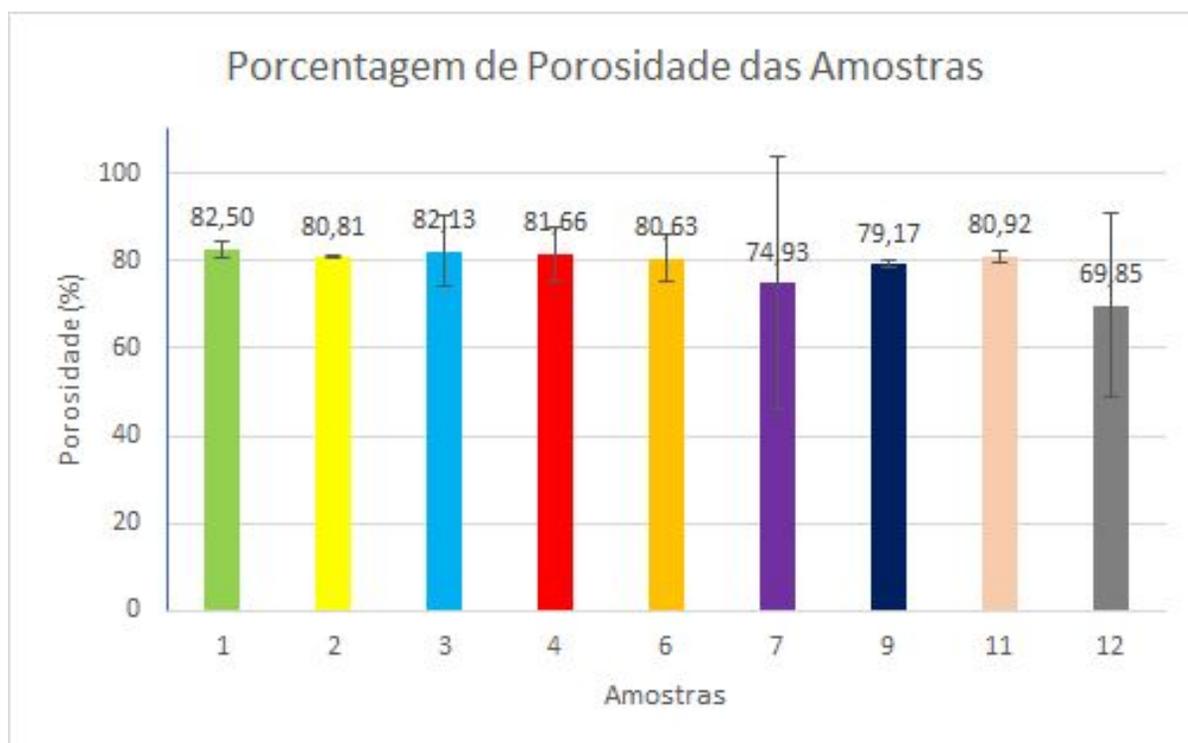
A tabela 7 e a figura 40 mostram as médias e desvios padrão para cada amostra, cuja porosidade foi calculada em duas fotos representativas de regiões diferentes.

**Tabela 7:** Tabela da porcentagem de porosidade de cada imagem e a respectiva média e desvio padrão para a amostra.

	Amostras									
Porosidade (%)	1	2	3	4	6	7	9	11	12	
Medida 1	81,272	80,608	76,44	86,04	84,299	54,484	79,765	79,956	84,776	
Medida 2	83,73	81,00	87,83	77,29	76,95	95,37	78,57	81,88	54,93	
Média	82,50	80,81	82,13	81,66	80,63	74,93	79,17	80,92	69,85	
Desvio padrão	1,74	0,28	8,06	6,19	5,20	28,91	0,84	1,36	21,11	

As duas amostras com menor porcentagem de porosidade e grande desvio padrão (7 e 12) se justificam pelas fotos distintas obtidas pelo MEV tanto de uma porção com bastante fibra quanto de outra praticamente sem fibra. As demais amostras apresentaram resultados coerentes.

**Figura 40:** Gráfico da porcentagem de porosidade das amostras com desvio padrão.



Fonte: Do próprio autor.

A Tabela 8 resume as características qualitativas da presença de fibra, filme e partícula nas amostras, juntamente com os valores quantitativos das respectivas espessuras médias das fibras e porcentagens de porosidade.

**Tabela 8:** Tabela do Excel com as características analisadas mais relevantes das amostras.

Amostra	Concentração (%)	Pressão (psi)	Distância (cm)	Rotação (rpm)	Fibras	Filme	Partículas	Espessura média de Fibra (nm)	Porosidade (%)
1	6	35	15	55	muito	pouco	pouco	504,03	82,5
2	6	35	15	55	muito	muito	pouco	626,54	80,81
3	6	35	15	250	muito	pouco	muito	422,22	82,13
4	6	35	15	250	muito	nada	muito	463,1	81,66
5	8	35	15	55	nada	muito	muito	"_"	"_"
6	8	35	15	250	muito	pouco	pouco	366,98	80,63
7	6	35	10	250	muito	muito	pouco	703,51	74,93
8	6	35	10	55	nada	muito	muito	"_"	"_"
9	6	30	15	55	muito	muito	pouco	648,55	79,17
10	6	30	10	55	pouco	muito	muito	"_"	"_"
11	6	30	10	250	muito	muito	pouco	336,25	80,92
12	6	30	15	250	muito	muito	pouco	529,9	69,85
13	6	35	15	55	nada	muito	muito	"_"	"_"

## 5. CONCLUSÃO

A técnica de *airbrushing* utilizada na confecção de arcabouços nanofibrosos de PLDLA ainda não foi muito explorada e apresenta desafios a serem superados com relação à sua reprodutibilidade, já que devido às características artesanais da técnica, o controle dos parâmetros do processo é prejudicado e, conseqüentemente, é difícil a obtenção de amostras homogêneas.

Neste estudo foi possível constatar a influência positiva da rotação do coletor na captação das fibras, assim como no estreitamento da distribuição de espessuras das mesmas, o que, como discutido anteriormente, provavelmente se deve à limitação na captação de fibras muito finas e muito grossas, devido à velocidade de rotação muito alta do cole

Entretanto não foram observadas outras correlações, nem mesmo com a concentração da solução. É possível que o número de amostras seja muito pequeno para qualquer relevância estatística e que o caráter artesanal da técnica sofra variações significativas não relacionadas aos parâmetros pré-definidos.

A necessidade desses materiais se fazem sentir pela própria demanda por alternativas terapêuticas mais eficazes e baratas para ajudar o maior número possível de pessoas. Tanto a técnica como o polímero se mostram bastante promissores para futuros estudos que permitam corroborar novas correlações e compreender outras influências no processo de confecção de mantas. Em consequência disso, novos trabalhos devem ser realizados para correlacionar mais parâmetros com a produção de mantas nanofibrosas de PLDLA.

## REFERÊNCIAS

COHEN, Steven R. *et al.* **Technical strategies tacks: A new technique for craniofacial fixation.** Journal Craniofacial Surgery, v. 12, p. 596-602, 2001.

DARISTOTLE, John L. *et al.* **A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning.** ACS Applied Materials Interfaces, v. 8, p. 34951–34963, 2016.

FISHER, Matthew B.; MAUCK, Robert L. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation.** Tissue Engineering: Part B, v. 19, p. 1-13, 2013.

GIORNO, Luciana P.; RODRIGUES, Leonardo R.; SANTOS Jr., Arnaldo R. **Biomedical graft technologies: An overview.** Stem Cell Research & Therapeutics, v. 4, p. 135-141, Mai 2019.

HENCH, Larry L. **Biomaterials: a forecast for the future.** Biomaterials, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

HELL, Alessandra F. *et al.* **Production of fibrous polymer scaffolds for tissue engineering using an automated solution blow spinning system.** Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 34, n. 3, p. 273-278, Set. 2018.

IGUMA, Thais S.; MALMONGE, Sônia Maria; SANTOS Jr., Arnaldo R. **Natural fibrous polymers for tissue engineering.** Stem Cell and Regenerative Medicine, v. 3, p. 1-10, 2019.

ISO 10993-5: 2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.

LANDES, Constantin A. *et al.* **Resorbable plate osteosynthesis of dislocated or pathological mandibular fractures: a prospective clinical trial of two amorphous**

**L-/DL-lactide copolymer 2mm miniplate system.** Plastic Reconstructive Surgery, v. 111(2), p. 601-10, 2003.

LANGER, Robert; VACANTI, Joseph P. **Tissue Engineering.** Science, v.260, p. 920-926, 1993.

LI, Jianming; CONNELL, Sean; SHI, Riyi. **Biomimetic architectures for tissue engineering.** Biomimetics Learning from Nature, p. 487- 507, 2010.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock.** 14. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MALMONGE, Sônia Maria *et al.* **Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo *in vitro*.** Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 15, n. 1-2, p. 49-54, 1999.

MARTINS, Kelly F. *et al.* **Preparation and characterization of paclitaxel-loaded PLDLA microspheres.** Materials Research, v. 17, n. 3, p. 650-656, 2014.

MÁS, Bruna A. *et al.* **Biological Evaluation of PLDLA Polymer Synthesized as Construct on Bone Tissue Engineering Application.** Materials Research, v. 19, n. 2, p. 300-307, 2016.

MEDEIROS, Eliton S. *et al.* **Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions.** Journal of Applied Polymer Science, v.113, n.4, p. 2322-2330, 2009.

MESSIAS, André D. *et al.* **Synthesis, Characterization, and Osteoblastic Cell Culture of Poly(L-co-D,L-lactide-co-trimethylene carbonate) Scaffolds.** International Journal of Biomaterials, vol. 2014, 501789, 2014.

MOTTA, Adriana C.; DUEK, Eliana A. R. **Estudo inicial da degradação "*in vivo*" de poli(L-co-D,L ácido láctico), sintetizado em laboratório, aplicado como prótese tibial em coelhos.** Matéria (Rio de Janeiro), v. 14, n. 3, p. 1070-1075, 2009.

MOTTA, Adriana C.; DUEK, Eliana A. R. **Síntese e caracterização do copolímero poli(L-co-D,L Ácido Láctico)**. *Polímeros*, v. 17, n. 2, p. 123-129, 2007.

OLIVEIRA, Juliano E. *et al.* **Fiação por Sopro em Solução: Um Novo Método para produção de nanofibras de poli(óxido etileno)**. II Simpósio Paulista de Nanotecnologia, Bauru, 2010.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M.. **Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado**. *Química Nova*, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PUNJA, Karim G. *et al.* **Reconstruction of complex orbitocranial deformities using bioresorbable mesh, sterilized orbital models and *in situ* contouring**. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 22, n.1, p. 20-24, 2006.

SANTOS Jr., Arnaldo R.; WADA, Maria Lucia F. **Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.

SANTOS Jr., Arnaldo R.; ZAVAGLIA, Cecília Amélia C.. **Tissue engineering concepts**. In: Saleem Hashmi (editor-in-chief), *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Oxford: Elsevier, p. 1-5, 2016.

SIMBARA, Márcia M. O. *et al.* **Comparative study of aligned and nonaligned poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous scaffolds prepared by solution blow spinning**. *Journal of Biomedical Materials Research part B*, v. 107, n. 5, p.1462-1470, 2018.

SOUZA, Michelle A. *et al.* **Controlled Release of Linalool Using Nanofibrous Membranes of Poly(lactic acid) Obtained by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study**. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15, p. 5628–5636, 2015.

TARUN, Garg *et al.* **Scaffold: Tissue engineering and regenerative medicine**. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 2, n.12, p. 37-42, 2011.

TIIHONEN, Raine. P. *et al.* **Reconstruction of the trapeziometacarpal joint in inflammatory joint disease using interposition of autologous tendon or poly-L-D-lactic acid implants: A prospective clinical trial.** *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, v. 46, n.2, p. 113-119, 2012.

VIINIKAINEN, Anna-Kaarina *et al.* **Bioabsorbable poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 triple-stranded bound suture in the modified Kessler repair: an ex vivo static and cyclic tensile testing study in a porcine extensor tendon model.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, p.1963-1969, 2009.

WILLIAMS, David F. **On the nature of biomaterials.** *Biomaterials*, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.